

Aus dem Institut für Medizinische Psychologie der Universität  
Tübingen

**Einfluss von Schlaf und circadianer Rhythmik auf die  
Integrin-Aktivierung von Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Szczepanski, Michael  
2020

Dekan (komm.): Professor Dr. D. Wallwiener

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Born

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. K.Hamprecht

Tag der Disputation: 11.05.2020

Für meine geliebte Familie

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	8
1 Einleitung.....	11
1.1 Schlaf .....	12
1.1.1 Schlafstadien.....	12
1.1.2 Effekt des Schlafes auf den Hormonhaushalt.....	13
1.1.3 Interaktion zwischen Schlaf und Immunsystem.....	15
1.2 Circadiane Rhythmik.....	18
1.3 Immunsystem .....	18
1.3.1 Immunantwort.....	18
1.3.2 Die Bedeutung der Integrin-vermittelten T-Zell-Adhäsion für die Immunantwort.....	19
1.3.3 Inside-out signaling und Integrinaktivierung .....	20
1.4 Monitoring von Antigen-spezifischen T-Zellen .....	22
1.4.1 Messung von Antigen-spezifischen T-Zellen mittels mICAM-1.....	24
1.5 Virale Infektionen.....	25
1.5.1 Cytomegalie – Virus .....	25
1.5.2 Epstein-Barr-Virus .....	26
1.5.3 T-Zell-Antwort auf CMV und EBV .....	26
1.5.4 Effekt von neuroendokrinen Faktoren auf die Immunzelladhäsion ..	29
1.6 Fragestellungen und Hypothesen.....	31
2 Material und Methoden.....	33
2.1 Studiendesign.....	33
2.2 pMHC und ICAM-1-Multimere .....	36

2.3 Zellstimulation und mICAM-1-Anfärbung .....	36
2.4 Evaluation des Schlafes .....	38
2.5 Durchflusszytometrie .....	38
2.6 Statistik .....	40
3 Resultate .....	41
3.1 Schlaf der Studienteilnehmer .....	41
3.2 Gating von CMV- und EBV-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen und Beurteilung der $\beta_2$ - Integrin Aktivierung mittels Markierung mit mICAM-1 .....	45
3.3 Schlaf erhöht die $\beta_2$ -Integrin Aktivierung von CMV- und EBV-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	48
3.4 Gating der Subpopulationen von CMV- und EBV-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen und Beurteilung der $\beta_2$ -Integrin Aktivierung mittels Markierung mit mICAM-1	50
3.5 Schlaf erhöht selektiv die $\beta_2$ -Integrin Aktivierung von früh- und mitteldifferenzierten CMV-spezifischen T-Zellen .....	51
4 Diskussion .....	55
5 Zusammenfassung .....	60
Literaturverzeichnis .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
Erklärung zum Eigenanteil.....	71
Anhang .....	72
Danksagung .....	78
Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocortitropes Hormon
APC	Antigen-präsentierende Zellen
BMI	Body-Mass-Index
CCR	chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
CMV	Cytomegalievirus
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EEG	Elektroenzephalogramm
FACS	fluoreszenz-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
GH	growth hormone, auch Wachstumshormon
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
HLA	Human-like antigen
HPA- Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IgG	Immunglobulin G
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL-12	Interleukin-12
LFA	Leukozyten-Funktion-assoziiertes Antigen
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	Major histocompatibility complex
mICAM-1	ICAM-1-Multimere
min	Minuten
NaCl	Natrium-Chlorid
NREM	non-Rapid eye movement
PG	Prostaglandine
pMHC	peptide-loaded major histocompatibility complex

REM	rapid eye movement
S.	Seite
SF-A-R	Schlafragebogen Typ A-R
SLO	sekundäre lymphatische Organe
SSS	Stanford-Schläfrigkeitsskala
SWS	slow wave sleep
Tab.	Tabelle
T <sub>CM</sub>	central memory T cells
T <sub>EM</sub>	CD45RA+ effector memory T-cells
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor alpha
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1;	Korrelation während des Schlafes zwischen den Schlafstadien und der Hormonausschüttung je nach Uhrzeit.....	14
Abbildung 2;	Schematische Darstellung der Interaktion von Immunsystem und Hormonhaushalt während des Schlafes .....	17
Abbildung 3;	Inside-out-signaling: Konformationsänderung und Clustering .....	21
Abbildung 4;	Integrin-vermittelte Adhäsion am Beispiel der T-Zelle .....	22
Abbildung 5;	Bindung TCR und Tetramer mittels Streptavidin-Molekül.....	23
Abbildung 6;	Interaktion T-Zelle und TCR mit folgendem inside-out-signaling sowie Integrinaktivierung .....	24
Abbildung 7;	Darstellung der einzelnen Subtypen von CD8+ T-Zellen .....	28
Abbildung 8;	Schema der Blutentnahmen in den Bedingungen „Schlaf“ und „Wach“;.....	35
Abbildung 9;	Darstellung der Blutentnahme unter Laborbedingungen sowie des Hypnogrammsettings, in Bezug auf die Uhrzeit .....	35
Abbildung 10;	Arbeitsschritte im Rahmen der mICAM-1-Anfärbung .....	37
Abbildung 11;	Schematische Darstellung eines FACS-Gerätes.....	39
Abbildung 12;	Mittelwert (MW) -Entwicklung des Wertes der Stanford-Schläfrigkeitsskala (SSS) unter standardisierten Schlafbedingungen.....	42
Abbildung 13;	Mittelwert (MW) -Entwicklung des Wertes der Stanford-Schläfrigkeitsskala (SSS) unter Schlafenzug.....	42
Abbildung 14;	SF-A-R: Auswertung zum Befinden der Probanden .....	44
Abbildung 15;	FACS-basierte Analyse und Gating der CD8+ T-Zellen mittels Dichtediagramm .....	46



Abbildung 16;	FACS-basierte Analyse und Darstellung von CMV-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen unter Abwesenheit von Epinephrin.....	46
Abbildung 17;	FACS-basierte Analyse und Darstellung von EBV-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen unter Abwesenheit von Epinephrin.....	47
Abbildung 18;	Schlaf erhöht die $\beta_2$ -Integrin-abhängige Aktivierung von Antigen-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	49
Abbildung 19;	Effekt von $\beta_2$ -AR-Agonisten auf pMHC-induzierte $\beta_2$ -Integrin-Aktivierung von CMV-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen ...	51
Abbildung 20;	Schlaf erhöht die $\beta_2$ -Integrin-abhängige Aktivierung von CMV-spezifischen Subpopulationen.....	53
Tabelle 1;	Durchschnittliche Dauer der Schlafphasen der drei EEGs samt Abbildung des durchschnittlichen Standardfehlers.....	41



## 1 Einleitung

Der Schlaf nimmt einen großen und wichtigen Teil im Leben vieler Organismen ein. Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte wurde der enorme Stellenwert des Schlafes für Gesundheit durch wissenschaftliche Studien untermauert (Sandoval *et al.*, 2018; Lange *et al.*, 2010; Besedovsky *et al.*, 2012; Besedovsky *et al.*, 2019). Eine Tatsache, die der Volksmund schon lange mit dem Ausspruch „Schlaf ist die beste Medizin“ belegt. In den letzten Jahren wurden zudem immer mehr Hinweise entdeckt, dass Schlaf eine wichtige Rolle im Rahmen der Gedächtnisbildung auf Ebene des Immunsystems, des Lernens und des Stoffwechsels inne hat (Dimitrov *et al.*, 2015; Rasch and Born, 2013; Besedovsky *et al.*, 2012; Lange *et al.*, 2011; Diekelmann and Born, 2010; Lange *et al.*, 2010; Lange *et al.*, 2019). Im Rahmen der erworbenen Immunantwort stellen besondere Lymphozyten, die zytotoxischen T-Zellen, einen wichtigen Akteur dar. Im Zusammenspiel mit dem Nerven- und Hormonsystem unseres Körpers ergeben sich interessante Fragestellungen für die Grundlagenforschung und die kurative Schulmedizin. In dieser Darlegung imponieren die Wechselwirkungen zwischen dem Zusammenhang von Schlaf und circadianer Rhythmik auf die Integrin-vermittelte Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, einem wichtigen Schritt im Zuge der adaptiven Immunantwort.

## 1.1 Schlaf

Schlaf ist der gegenteilige Zustand des Wachseins, „definiert als ein schneller reversibler Zustand reduzierter Antwortbereitschaft auf Umgebungsreize und allgemein verminderter Interaktion mit der Umwelt“ (Klinke *et al.*, 2010) und insgesamt ein lebensnotwendiger Prozess (Schedlowski and Tewes, 1999). Schlafqualität als auch Schlafquantität haben einen Einfluss auf die Gesundheit des Organismus, hingegen führt mehrtägiger Schlafentzug zum Tod von Versuchstieren (Kwon *et al.*, 2018; Sandoval *et al.*, 2018; Covassin and Singh, 2016; Ferrie *et al.*, 2007). Aufmerksamkeit, Muskelaktivität und Energieverbrauch sind währenddessen auf ein sehr niedriges Niveau reduziert. Physiologisch und auf Ebene des körpereigenen Hormonaushalts ist der Status des Schlafes von Koma und Wachheitszustand abzugrenzen, ist insgesamt nicht willkürlich und folgt einer circadianen Rhythmik (Schedlowski and Tewes, 1999).

### 1.1.1 Schlafstadien

Im Allgemeinen wird zwischen REM- und „non-rapid eye movement“ (NREM)-Schlafstadien unterschieden und ermöglicht anhand der Verteilung eine Beurteilung der Schlafqualität (Rechtschaffen A and Kales A, 1968), siehe bitte Abbildung 1a). Das Akronym REM bedeutet „rapid eye movement“ und impliziert einen schlafenden Organismus mit schnellen Augenbewegungen, erhöhter cerebraler Aktivität, aber reduziertem Muskeltonus sowie einer höheren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Träumen (Aserinsky and Kleitman, 1953; Dement and Kleitman, 1957). Blutdruck und Herzfrequenz sind im Vergleich zu den anderen Schlafstadien erhöht (Schedlowski and Tewes, 1999; Zanchetti *et al.*, 1982). Der NREM-Schlaf umschreibt vier Stadien mit den Bezeichnungen S1, S2, S3 sowie S4 und ist durch jeweilig spezifische Elektroenzephalogramm (EEG)-Muster charakterisiert (Rechtschaffen A and Kales A, 1968). Die Tiefe des Schlafes nimmt von S1 zu S4 zu. Stadium S1 weist im EEG typische Thetawellen auf und stellt den Übergang zwischen Wachheit und Schlaf dar (Klinke *et al.*, 2010). Das S2-Stadium enthält neben den Thetawellen

Schlafspindeln und K-Komplexe, deren Bedeutung bisher nicht bekannt ist (Klinke *et al.*, 2010). S3 und S4 sind durch den sogenannten „Slow-Wave-Schlaf“ (SWS bzw. „slow-wave sleep“), die auch Deltawellen genannt werden, charakterisiert und werden auch als Tiefschlaf bezeichnet. Das Erwachen ist demnach deutlich erschwert. Im Laufe der Nacht werden die Stadien von S1 über S2 und S3 bis S4 durchlaufen. Danach schließen sich nochmals S2 und schlussendlich das REM-Stadium an, bis der Kreislauf wiederbeginnt (Klinke *et al.*, 2010).

### **1.1.2 Effekt des Schlafes auf den Hormonhaushalt**

Im Laufe des Schlafes ergibt sich ein spezifisches Hormonmuster im Vergleich zum Wachzustand (Klinke *et al.*, 2010), dass in Abbildung 1b aufgezeigt ist. Der Parasympathikus ist während des Schlafes führend und Acetylcholin wird kontinuierlich ausgeschüttet. Währenddessen sind der Sympathikus und die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrindeachse herunterreguliert (Besedovsky *et al.*, 2012). Infolge dessen weist der Botenstoffe Cortisol sehr niedrige Plasmalevel auf (Lange *et al.* 2010). Die Ausschüttung von Norepinephrin sowie Epinephrin gehen vor allem im REM-Schlaf zurück (Born and Fehm, 1998; Davidson *et al.*, 1991). Ihre Höchstwerte erreichen zur Nacht unter anderem Melatonin, Prolactin, Leptin und das Wachstumshormon (auch „GH“ bzw. „growth hormone“), letzteres im SWS (Sadamatsu *et al.* 1995; Weitzman 1976; Lange *et al.* 2010). Für GH wurde zudem eine Schlaf-abhängige und Schlaf-unabhängige Ausschüttung diskutiert (Sadamatsu *et al.*, 1995). Eine verkürzte Schlafdauer deutet zudem auf erhöhte Cortisolspiegel am Abend sowie insgesamt verringerte Leptin-Spiegel, verbunden mit einer erniedrigten Glucosetoleranz und erniedrigter Insulinsensitivität (Leproult and van Cauter, 2010).

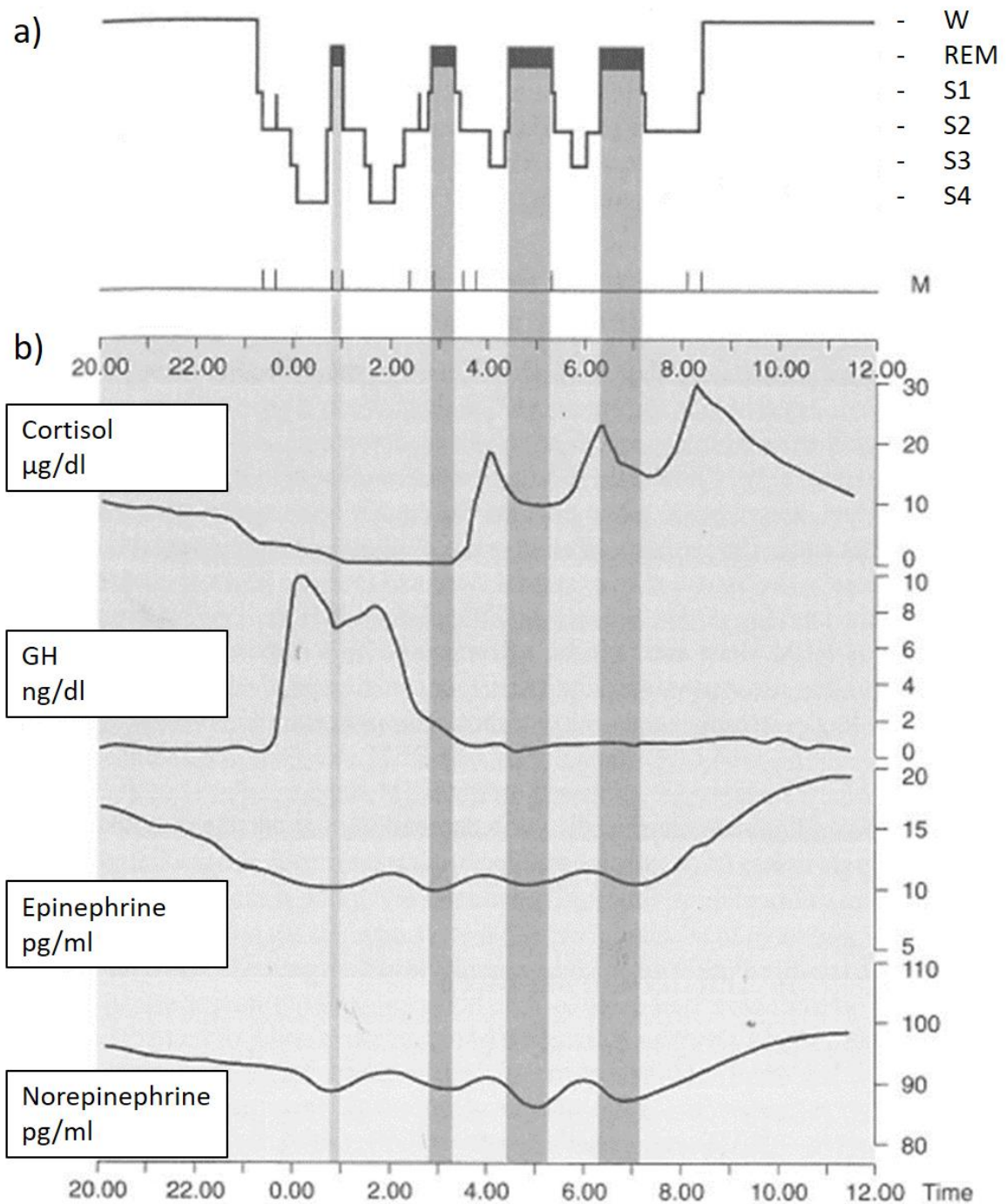


Abbildung 1; Korrelation während des Schlafes zwischen den Schlafstadien und der Hormonausschüttung je nach Uhrzeit

Die x-Achse zeigt die jeweilige Uhrzeit. Die y-Achse zeigt in Abschnitt a) das jeweilige Schlafstadium, in Abschnitt b) die Konzentration samt zugehörigem Hormon.

a) Verteilung der Schlafphasen im Nachtverlauf; b) Hormonlevel von Cortisol, GH, Epinephrin und Norepinephrin im Zeitraffer (Schedlowski and Tewes, 1999)

### 1.1.3 Interaktion zwischen Schlaf und Immunsystem

Die Interaktionen zwischen Schlaf und Immunsystem laufen bidirektional ab (Besedovsky *et al.*, 2019). Erkrankungen erfordern eine erhöhte Schlafdauer bzw. ein erhöhtes Schlafbedürfnis (Schedlowski and Tewes, 1999), beispielhaft seien allgemein Infektionen wie grippale Infekte genannt. Aber auch die Schlafkrankheit, auch Afrikanische Trypanosomiasis, hervorgerufen durch die Tsetsefliege (Chimelli and Scaravilli, 1997) oder zentralnervöse Störungen wie die Narkolepsie (Arango *et al.*, 2015; Kothare and Kaleyias, 2008) führen zu einer gestiegenen Schlafdauer. Außerdem werden wichtige Prozesse des Immunsystems während des Schlafes moduliert, maßgeblich getriggert durch eine Herunterregulation des Sympathischen Nervensystems und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) (Lange *et al.*, 2010). Der Effekt der Erkrankungen wird mittels Zytokinen wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) vermittelt (Rockstrom *et al.*, 2018). Außerdem haben GH (Klinke *et al.*, 2010) und Prolactin (Klinke *et al.*, 2010) einen positiven Einfluss mittels Zytokinrezeptoren auf die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von T-Zellen, verbunden mit der Ausprägung eines immunologischen Gedächtnisses durch Ausbildung einer adaptiven Immunantwort (Besedovsky *et al.*, 2012). Insgesamt wurde im Laufe der letzten Dekaden deutlich, dass auf neuronaler wie auf Ebene des Immunsystems Lernprozesse sowie Gedächtniskonsolidierung ablaufen (Lange *et al.*, 2003; Lange *et al.*, 2011; Diekelmann and Born, 2010; Lange *et al.*, 2019). In Studien konnte ein höherer Impftiter nach Hepatitis-A-Impfung sowie eine erhöhte Anzahl von T-Helfer-Zellen nach Schlaf im Vergleich zu Schlafentzug konstatiert werden (Besedovsky *et al.*, 2012; Lange *et al.*, 2003; Lange *et al.*, 2019). Gleichsam wurde eine höhere Infektanfälligkeit bei Schlafmangel postuliert (Lange *et al.*, 2011).

Ein dauerhafter Schlafmangel steht im Verdacht chronischen Stress und somit eine chronische Entzündung hervorzurufen, während 24 Stunden Schlafentzug keinen relevanten Einfluss auf die Stressparameter wie Cortisol ausüben (Besedovsky *et al.*, 2012; Dimitrov *et al.*, 2019). Indes ist unter Schlafentzug die Zahl der Monozyten, natürlichen Killerzellen und der B- als auch T-Zellen erhöht, mutmaßlich der Redistribution der Lymphozyten während des Schlafes und des Schlafentzuges dienend (Besedovsky *et al.*, 2012; Dimitrov *et al.*, 2004).

In Tierversuchen wurde festgestellt, dass nach Antigenkontakt die Schlafdauer (insbesondere NREM) erhöht ist, hierbei wurde eine erhöhte Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , Prostaglandine (PG)D<sub>2</sub> und IL-1 registriert (Besedovsky *et al.*, 2019). Zudem konnte beim Mensch über die Gabe von Anti-TNF- $\alpha$  eine Zunahme der Schlafdauer – als auch Qualität gemessen werden (Besedovsky *et al.*, 2019), sodass insgesamt von einem wichtigen Einfluss des Immunsystems auf den Schlaf auszugehen ist. Zudem wurde Zusammenhang zwischen einer Zunahme der Körperkerntemperatur und der NREM-Dauer konstatiert, sodass von einer Fieber-induzierten Zunahme der Schlafdauer auszugehen ist (Krueger and Opp, 2016; Sato *et al.*, 2015). Die Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , PGD<sub>2</sub> und IL-1 als auch die Fieberinduktion wird durch das Pathogen bzw. dessen Metabolite, zum Beispiel Lipopolysaccharid, verursacht (Besedovsky *et al.*, 2019).



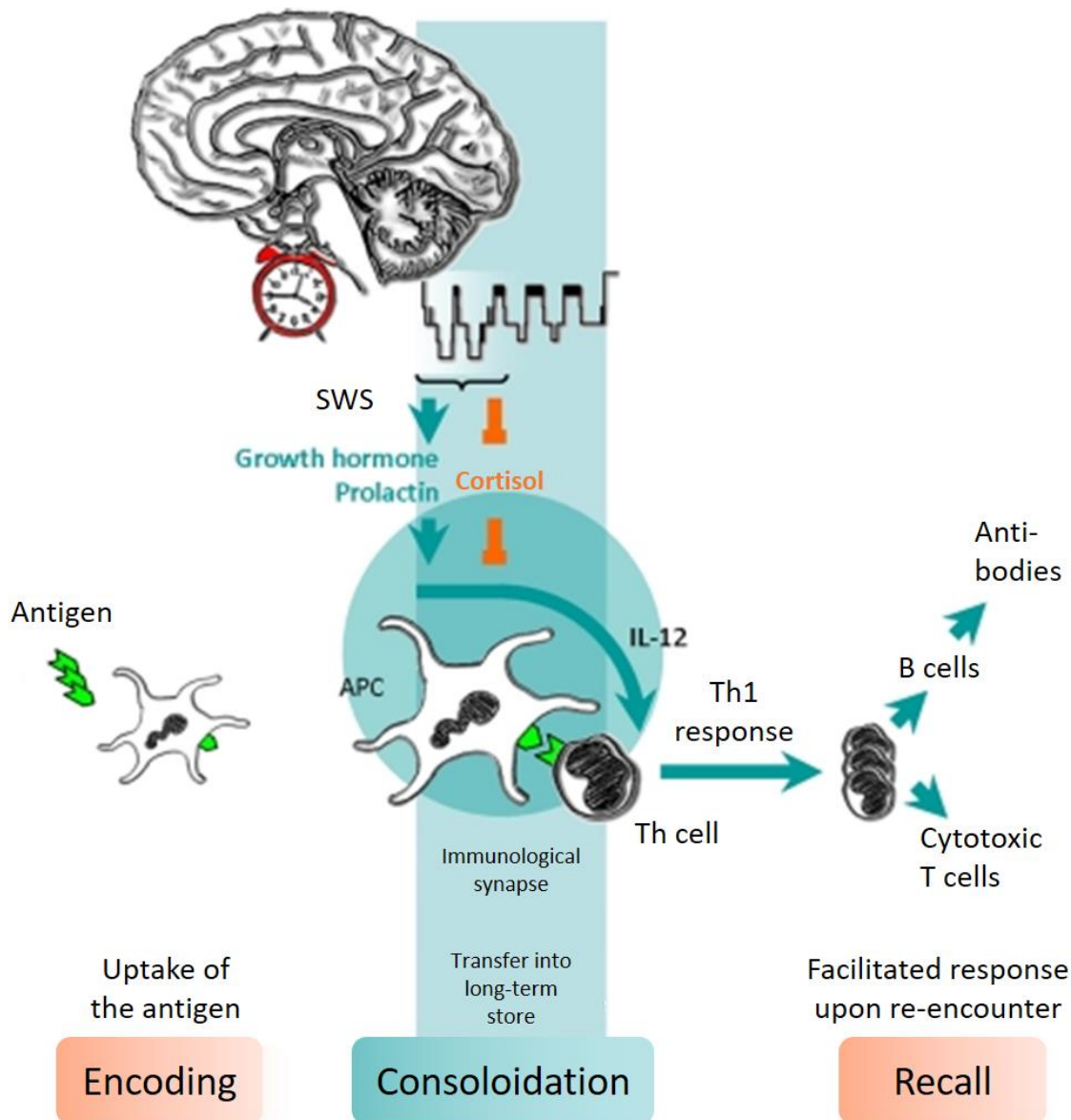


Abbildung 2; Schematische Darstellung der Interaktion von Immunsystem und Hormonhaushalt während des Schlafes: Schlaf begünstigt die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort. Das Antigen wird von APC aufgenommen und prozessiert sowie der T-Helfer-Zelle präsentiert. Die Ausschüttung von Interleukin-12 (IL-12) durch die Antigen-präsentierenden Zellen (APC) ermöglicht die Ausbildung von T-Helfer-Zellen sowie zytotoxischen T-Zellen und letztlich der Produktion von Antikörpern durch B-Zellen. Hierdurch wird ein Antigengedächtnis aufgebaut. Schlaf, und vor allem SWS, und die circadiane Rhythmik erschaffen mit niedrigen Leveln von Cortisol und erhöhten Spiegeln von GH und Prolaktin ein Umfeld von Hormonen, dass proinflammatorisch wirkt. Gemäß der Gedächtnisbildung in der Verhaltensneurobiologie kann man diese Vorgänge in "Encoding", "Consolidation" und "Recall" einteilen, wobei vor allem die Phase der "Consolidation" durch Schlaf positiv beeinflusst wird; aus (Besedovsky et al., 2012)

## 1.2 Circadiane Rhythmik

Der Begriff der circadianen Rhythmik beschreibt einen rezidivierenden Einfluss verschiedener Mediatoren auf den Organismus in Relation zum Wach-Schlaf-Status und umfasst wichtige Funktionen und Regelkreise, die sich auf das Immunsystem und Lernprozesse auswirken (S.860ff.; (Klinke *et al.*, 2010). Die ungefähre Dauer beträgt circa einen Tag, also 24 Stunden (Romeijn *et al.*, 2011). Besonderen Einfluss hierauf üben die körpereigenen Hormone wie z.B. Cortisol, Prostaglandine, Norepinephrin und Epinephrin sowie Adenosin aus, die während des Schlafes stark herunterreguliert sind (Dimitrov *et al.*, 2019). In den Morgenstunden nach dem Aufwachen findet sich ein Maximum, in den Abendstunden sind niedrige Konzentrationen zu verzeichnen. Insgesamt folgen sie einer circadianen Rhythmik, welche schematisch in Abbildung 1b auf Seite 14 dargestellt ist (Lange *et al.*, 2010; Dimitrov *et al.*, 2009; Weitzman, 1976).

## 1.3 Immunsystem

### 1.3.1 Immunantwort

Das Immunsystem des Menschen teilt sich in eine angeborene, unspezifische und eine erworbene, spezifische Immunantwort. Beide Einheiten bestehen aus einer humoralen und einer zellulären Gruppe. Die zelluläre Gruppe der angeborenen Immunantwort bilden die Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, während der humorale Anteil vornehmlich aus dem Komplementsystem, Lysozym und dem C-reaktivem Protein (CRP) besteht (Klinke *et al.*, 2010). Der zelluläre Anteil der adaptiven Immunantwort sind die T-Zellen, die unter anderem in T-Helfer- und in zytotoxische T-Zellen unterteilt werden. Die B-Zellen stellen über die Produktion von Antikörpern den humoralen Part der adaptiven Immunantwort (Klinke *et al.*, 2010) Die Zellen des Immunsystems lassen sich anhand bestimmter Oberflächenmerkmale namens „cluster of differentiation“ (CD) gruppieren (Klinke *et al.*, 2010). CD4 wird hauptsächlich auf T-Helfer-Zellen exprimiert, die entweder im Rahmen der B-Zell- oder T-Zellimmunantwort benötigt werden (Schedlowski and Tewes, 1999). Zellen, die durch CD8 charakterisiert sind, spielen eine große Rolle bei der Abwehr von Antigenen, insbesondere Viren, die ihnen über

Major-Histo-Compatibility (MHC)-I-Komplexe von antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden (Schedlowski and Tewes, 1999; Klinke *et al.*, 2010). MHC als Proteinkomplexe stellen körpereigene Antigene dar und dienen somit dem Erkennen körpereigener Zellen. Eine weitere Aufgabe kommt ihnen bei der Elimination von Tumorzellen zuteil. Für die Antigenpräsentation auf MHC-I oder MHC- II werden die Antigene zu Peptiden prozessiert. MHC I befindet sich auf allen Zellen, MHC-II hingegen nur auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie dendritischen Zellen, B-Zellen oder Makrophagen (Klinke *et al.*, 2010; Schedlowski and Tewes, 1999). Durch das Erkennen des Antigens wird eine Kostimulation der T-Zelle durch dendritische Zellen (Teil der APC) hin zur zytotoxischen Effektor-T-Zelle ausgelöst, die nun über das Blut in infizierte Körperareale auswandern kann. Bei den als fremd erkannten Zellen werden über Perforine aus zytotoxischem T-Zellen die Membranen aufgelöst und über die entstandenen Defekte Proteasen in das Innere der Zelle gebracht, die dort die Apoptose der infizierten Zelle auslösen (Klinke *et al.*, 2010; Pipkin and Lieberman, 2007).

### **1.3.2 Die Bedeutung der Integrin-vermittelten T-Zell-Adhäsion für die Immunantwort**

Die Zell-Zell-Bindung ist ein bedeutender Teil der T-Zell-Physiologie und der Effektor-T-Zell-Funktion. Der Beginn der T-Zell-Immunantwort und die Entwicklung der Gedächtnis- und Effektorzellen setzt eine kontinuierliche Zirkulation und Migration von T-Zellen durch den Blutkreislauf und sekundäre lymphatische Organe voraus (Müller-Esterl, 2018; Hogg *et al.*, 2011; Burbach *et al.*, 2007). Weiterhin ist ein Aufeinandertreffen von Fremdartigen, durch MHC-Komplexe präsentiert, mit den APCs oder den Zielzellen, zum Beispiel Virus-spezifischen Zellen zur Bildung einer Immunologischen Synapse erforderlich (Dustin, 2014; Dustin and Long, 2010; Fooksman *et al.*, 2010; Grakoui *et al.*, 1999; Hogg *et al.*, 2011; Abram and Lowell, 2009). Die zirkulierenden T-Zellen exprimieren eine hohe Anzahl von membrangebundenen Integrinen (Dimitrov *et al.*, 2009; Dimitrov *et al.*, 2010), die sich jedoch in einem Nicht-Bindungs-Status befinden (Springer and Dustin, 2012; Abram and Lowell, 2009). Die augenblickliche Integrinaktivierung, hervorgerufen durch

Chemokin-Rezeptor-assoziierte Signale, ist essentiell für das Eintreten der T-Zellen in normales und lymphatisches Gewebe und folgender Migration durch Interaktion der Stromazellen unter entzündlichen und nicht-entzündlichen Bedingungen (Chigaev *et al.*, 2007; Dimitrov *et al.*, 2009; Dimitrov *et al.*, 2010). Das Erkennen sowie die starke Bindung der T-Zellen zu den APCs oder den Zielzellen und die Ausbildung der Immunologischen Synapse wird durch die Aktivierung durch Integrine ermöglicht, unter anderem durch das Leukozyten-Funktion-assoziierte Antigen (LFA-1), seinerseits initiiert durch die T-Zell-Rezeptor (TCR) -Aktivierung nach MHC-Präsentation von entsprechenden Peptiden (Hogg *et al.*, 2011; Burbach *et al.*, 2007). Die Integrinaktivierung in beiden Signalwegen wird durch eine Abfolge von Signalen namens inside-out signaling induziert (Hynes, 1992, 2002).

### **1.3.3 Inside-out signaling und Integrinaktivierung**

Inside-out-signaling beinhaltet Konformationsänderungen der Integrine, die ihrerseits mit erhöhter Bindungsaffinität zu den Liganden als auch einer Clusterbildung in der Membran einhergehen (Hynes, 1992, 2002; Burbach *et al.*, 2007; Abram and Lowell, 2009), dargestellt in Abbildung 3 auf Seite 21. Inside-outside-signaling ermöglicht einen stabilen Kontakt zwischen T-Zelle und Endothel, APC oder den Zielzellen (Hogg *et al.*, 2011). Abbildung 4a auf Seite 22 zeigt die Phasen der Integrinaktivierung. Initial erzeugen Selektine in der Selektinphase auf der Oberfläche von Endothelzellen ein Anheften und Rollen der T-Zellen („chemoattraction“ and „rolling“) (Heinrich *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2009; Butcher, 1991). Durch Expression von „vascular adhesion molecule 1“ (VCAM-1) und „intracellular adhesion molecule 1“ (ICAM-1) („Integrinphase“) durch das Endothel binden konsekutiv die T-Zellen, stimuliert durch TNF- $\alpha$  und Interleukin 1 (IL-1), ans Endothel (Butcher, 1991; Evans *et al.*, 2009; Chigaev *et al.*, 2007; Heinrich *et al.*, 2014). Es resultiert der „Arrest“ bzw. die Bindung der T-Zellen ans Endothel (Ley *et al.*, 2007). Nächster Schritt ist die Diapedese der T-Zellen (Heinrich *et al.*, 2014), der durch die Adhäsionsmoleküle JAM1, CD39 und CD44 vermittelt wird (Wang and Rudd, 2008). Der antigenspezifische und mit dem CD3-Komplex verbundene membranständige TCR wird durch den Kontakt der APC oder den Zielzellen mit dem T-Lymphozyten aktiviert, vermittelt durch Integrine wie LFA-1

und Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (Heinrich *et al.*, 2014; Burbach *et al.*, 2007). Dieser in Abbildung 4b auf Seite 22 aufgestellte Prozess führt zur Ausbildung einer Immunologischen Synapse, die auch als „supramolecule activation cluster“ (SMAC) bezeichnet wird. Aufgrund ihres Aufbaus wird sie in einen peripheren SMAC (pSMAC) und zentralen SMAC (cSMAC) unterteilt. Im pSMAC finden sich vor allem Adhäsionsmoleküle wie LFA-1, im cSMAC der zelluläre Anteil aus TCR und APC (Wang and Rudd, 2008).

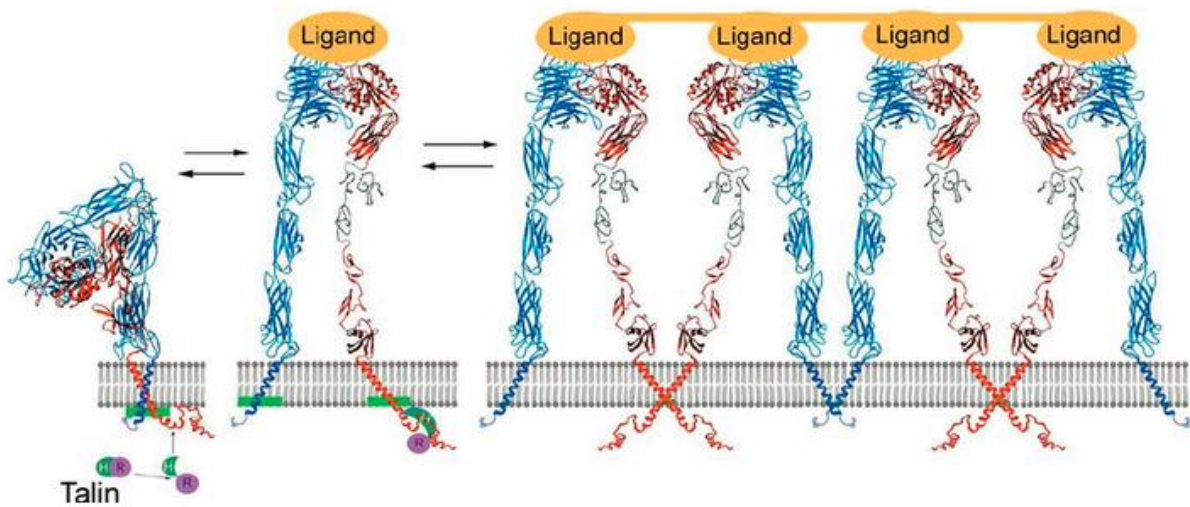


Abbildung 3; Inside-out-signaling: Konformationsänderung und Clustering ; aus (Qin *et al.*, 2004)

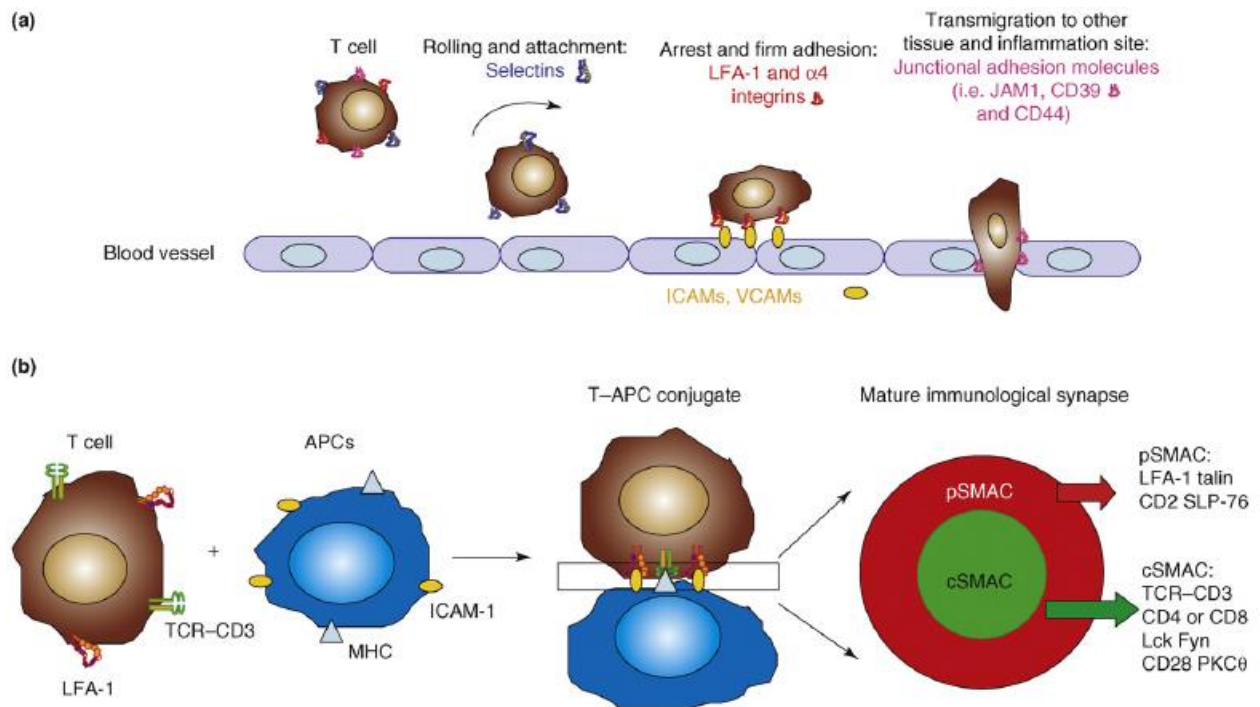


Abbildung 4; Integrin-vermittelte Adhäsion am Beispiel der T-Zelle; a) Darstellung der einzelnen Schritte Selektinphase, Integrinphase und Diapedese einer T-Zelle mithilfe von Adhäsionsmolekülen; b) Schema zur Ausbildung einer Immunologischen Synapse mit cSMAC und pSMAC nach Kontakt von APC und T-Zelle; aus (Wang and Rudd, 2008)

## 1.4 Monitoring von Antigen-spezifischen T-Zellen

Die Messung von Antigen-spezifischen T-Zellen stellt ein wichtiges Werkzeug zum Monitoring von Immunantworten nach Impfung sowie zum Verlauf von Infektionen, ferner zur Einschätzung der Stärke des Immunsystems dar. Antigen-spezifische T-Zellen können nach funktionellen oder phänotypischen Merkmalen identifiziert werden. Der funktionellen Differenzierung dienen Korrelate der Zytokinproduktion, zum Beispiel TNF- $\alpha$  und Interferon (INF)- $\gamma$ , der Zytotoxizität, die mittels der Mobilisierung von CD107a abgeleitet werden kann, sowie den exprimierten Oberflächenmolekülen CD137 und CD154 (Dimitrov *et al.*, 2015; Betts *et al.*, 2003; Wolfl *et al.*, 2007; Moller *et al.*, 2011). Für die phänotypische Beurteilung wird der „peptide-loaded major-histocompatibility complex“ (pMHC) genutzt (Altman *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2016). Der TCR erkennt das Antigen-Peptid mittels MHC-Präsentation, also dem pMHC

(Altman *et al.*, 1996). Dieses ist *in vitro* aber schnell dissoziierend und mit niedriger Affinität zum TCR charakterisiert (Davis *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2016). Mittels Tetramisierung und Bindung an z.B. an ein fluoreszenzmarkiertes Streptavidin-Molekül (siehe Abbildung 4, Seite 22) wird die Affinität deutlich erhöht und im „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) erkennbar (Huang *et al.*, 2016). Hieraus ergab sich über den möglichen Austausch von Peptiden auf den MHC-Molekülen eine weitere immense Multiplikation der Möglichkeiten (Davis *et al.*, 2011; Toebes *et al.*, 2006).

## Stable interaction

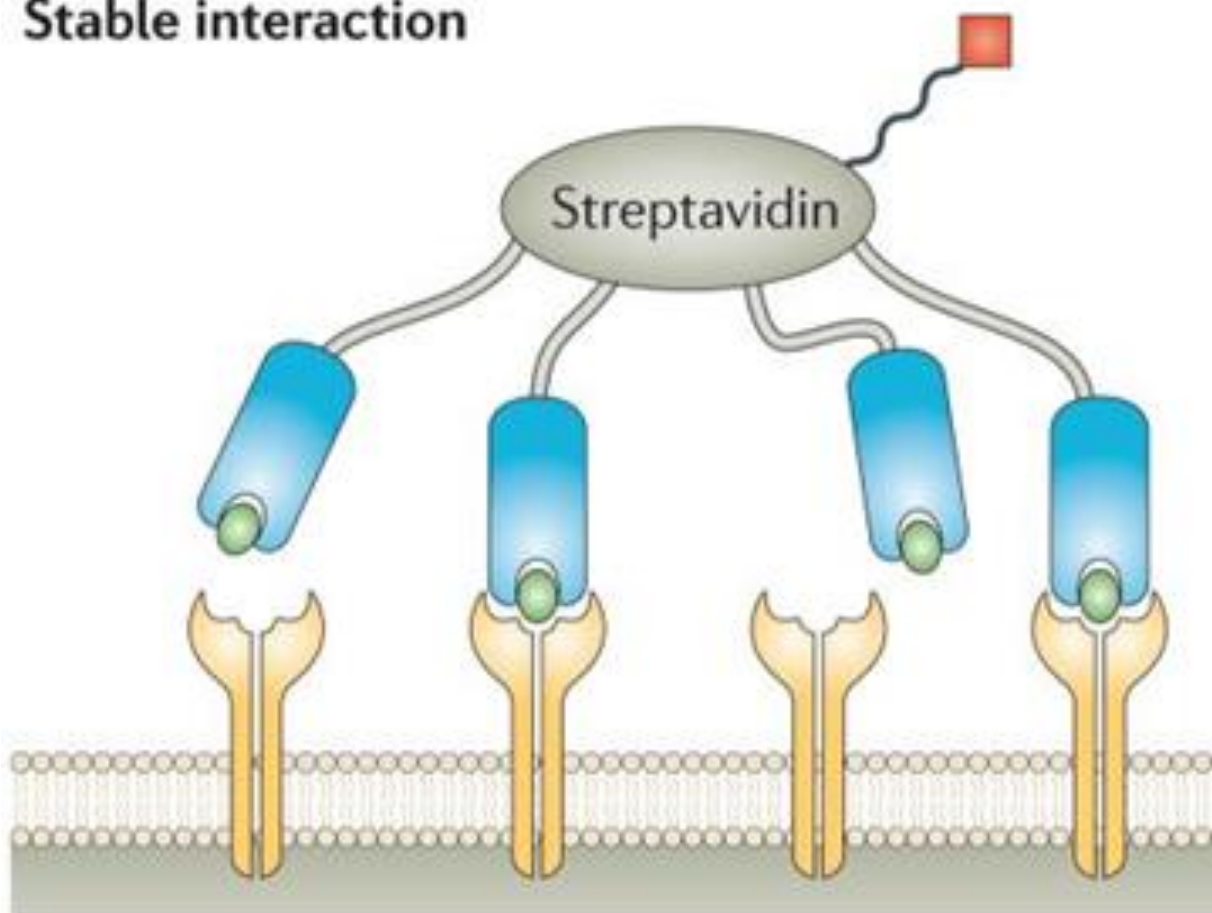


Abbildung 5; Bindung TCR- und Tetramer mittels Streptavidin-Molekül; aus (Davis *et al.*, 2011)



### 1.4.1 Messung von Antigen-spezifischen T-Zellen mittels mICAM-1

Eine neue zytometrische Methode wurde im Jahre 2018 entwickelt und stellt ebenfalls eine FACS-vermittelte Anwendung dar (Dimitrov *et al.*, 2018). Im Rahmen der TCR – und Antigeninteraktion bindet ICAM-1 an aktivierte  $\beta_2$ -Integrine (Rothlein *et al.*, 1986; Davis *et al.*, 1998). In vitro ist ICAM-1 ebenfalls schnell löslich und mit geringer Affinität gekennzeichnet (Tominaga *et al.*, 1998). Nun wurden durch unsere Gruppe ICAM-1-Multimere (mICAM-1) aus rekombinanten humanem ICAM-1-Fc und fluoreszenzmarkierten Anti-Fc-Fragmenten des Schafes hergestellt, die an aktivierte  $\beta_2$ -Integrine binden und somit die sofortige Untersuchung der Antigen-spezifischen T-Zelle ermöglichen (siehe Abbildung 6, Seite 24, (Dimitrov *et al.*, 2018). In den Versuchen konnten zudem Korrelate von CD107a, INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  auf und sprechen somit für den Nachweis von funktionalen T-Zellen nach Cytomegalie-Virus- (CMV), Epstein-Barr-Virus- (EBV) oder Influenza-Virus-Kontakt oder nach einer Impfung, z.B. einer Gelbfieberimpfung (Dimitrov *et al.*, 2018).

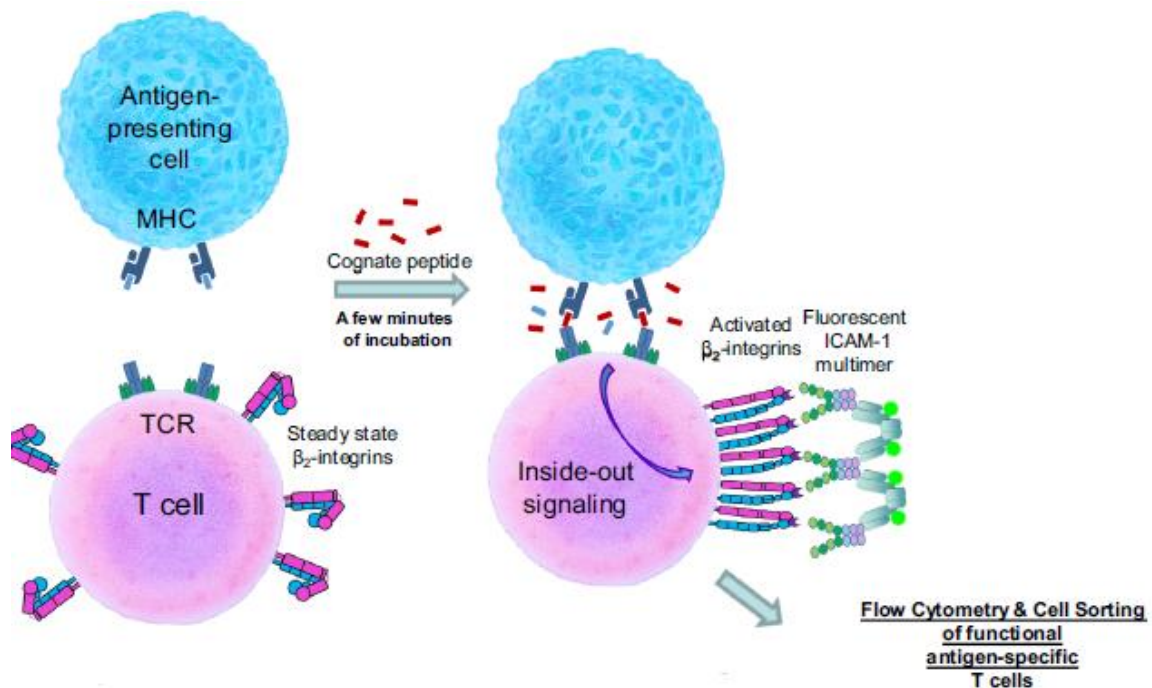


Abbildung 6; Interaktion T-Zelle und APC, folgend inside-out-signaling mit Clustering und Konformationsänderung; konsekutiv erfolgte die FACS-Analyse; aus (Gouttefangeas *et al.*, 2019)



## 1.5 Virale Infektionen

Viren sind kleine infektiöse Partikel, die sich nicht selbst reproduzieren können und auf Wirte angewiesen sind (Lodish *et al.*, 2000). Es gibt auf der Erde über  $10^{31}$  verschiedene Virusarten (Breitbart and Rohwer, 2005). Das Genom kann als Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA) vorliegen (Lodish *et al.*, 2000). Ihre Übertragung im Rahmen von viralen Infekten verläuft extrazellulär, hierbei überwinden sie die Schutzmechanismen des Wirtes, in dem sich dann fortpflanzen (Lodish *et al.*, 2000). Bei dieser Art von Infektionen gelingt es Viren die Schutzmechanismen des Wirtes zu überlisten. Im Rahmen der Vermehrung der Viren kommt es zu einer Entzündungsreaktion bzw. der eigentlichen Erkrankung (Lodish *et al.*, 2000). Die Übertragungswege umfassen die Tröpfcheninfektion, die Kontakt- bzw. Schmierinfektion sowie der Austausch von Körperflüssigkeiten, wobei die durch Insekten übertragenen Virusinfektionen als Sonderfall gelten (Herold, 2017).

### 1.5.1 Cytomegalie – Virus

Der Cytomegalievirus gehört zur Familie der Herpesviren (Herpesviridae) und wird auch unter der Bezeichnung HHV-5 geführt (Herold, 2017). Das Virus wird oral-oral, sexuell, mittels Muttermilch, Transfusionen oder Transplantationen übertragen. In Deutschland sind ungefähr 50% der Bevölkerung damit infiziert (Herold, 2017; Robert-Koch-Institut). CMV-spezifische T-Zellen umfassen bis zu 6 und 11 Prozent der CD4- und CD8 T-Zellen und zeigen Phänotypen aller Differenzierungsstadien, wobei spätdifferenzierte T-Zellen und Effektorgedächtnis-T-Zellen ( $T_{EM}$ ) eine klare Dominanz aufweisen (Lachmann *et al.*, 2012; Waller *et al.*, 2008; Stubbe *et al.*, 2008). Eine unterdrückte zelluläre Immunität führt zu einer CMV-Reaktivierung und –Replikation (Ljungman *et al.*, 2002). Bisweilen kann eine CMV-Reaktivierung sogar in gesunden CMV-Trägern beobachtet werden (Toro and Ossa, 1996). Anhand der gesteigerten Anzahl von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei CMV-positivem Status erfolgte die Untersuchung des Einflusses von Schlaf und circadianer Rhythmik auf die Integrinaktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei CMV-positiven Probanden.

### 1.5.2 Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus wird als doppelsträngiges Desoxynukleinsäure (DNA) -Virus ebenfalls zu den Herpesviren (Herpesviridae) gezählt und ist der Verursacher des Pfeiffer'schen Drüsenfiebers (Herold, 2017). In Deutschland als auch weltweit wird von einer Durchseuchungsrate von 90% ausgegangen, die Übertragungswege lauten oral-oral, fäkal-oral sowie per Sexualkontakt als auch über das Blut (Maeda *et al.*, 2009; Yachie *et al.*, 2003; Herold, 2017; Smart, 1999). Befallen werden vor allem die B-Lymphozyten des lymphoiden Systems, z.B. findet sich in der Parotis eine lebenslange Viruspersistenz mit intermittierender Virusproduktion (Nowalk and Green, 2016; Morgan *et al.*, 1979; Jondal and Klein, 1973; Pattengale *et al.*, 1973). Zur Elimination einer akuten Infektion, die häufig mit klassischen Beschwerden der Entzündung sowie oropharyngealen Beschwerden einhergeht, seltener Hepatitis-ähnlichen Symptomen, werden CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten rekrutiert, die auch der Elimination latent infizierter B-Lymphozyten dienen (Amon and Farrell, 2005; Smart, 1999). Hinsichtlich der bekannten erhöhten Anzahl von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei EBV-positiven Patienten erfolgte eine entsprechende Berücksichtigung in dieser Studie in Bezug auf die Messung der Integrinaktivierung von EBV-spezifischen T-Zellen.

### 1.5.3 T-Zell-Antwort auf CMV und EBV

Appay *et al* zeigten, dass die Immunantwort auf CMV und EBV bezüglich der T-Zellen in drei Gruppen spezifiziert werden kann: je nach CD-Expression in die Gruppe der „early“ (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>), „intermediate“ (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) und „late-differentiated“ (CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>). Dies ist in Abbildung 7 veranschaulicht (Appay *et al.*, 2002). Im Rahmen einer CMV-Infektion zeigen sich charakteristische Veränderungen der Lymphozytenuntergruppen, insbesondere eine Zunahme und Aktivierung der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und der NK-Zellen (Waller *et al.*, 2008). Der Cytomegalievirus besitzt vielfältige Mechanismen für eine lebenslange Latenz. CMV unterdrückt beispielsweise die MHC-Klasse-I-Antwort innerhalb von infizierten Zellen und behindert zudem die IFN- $\gamma$ -

induzierte MHC-Klasse-II-abhängige Aktivierung der Makrophagen (Waller *et al.*, 2008; Barnes and Grundy, 1992). Der Virus codiert außerdem für Proteine, die die Präsentation von viralen Peptid-Antigenen gegenüber T-Zellen negativ beeinträchtigen (Waller *et al.*, 2008).

Gleichermaßen birgt die Infektion mit EBV eine Lymphozytose, die durch eine reaktive Proliferation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen hervorgerufen wird, diese wiederum eliminieren die befallenen B-Lymphozyten (Pattengale *et al.*, 1973; Jondal and Klein, 1973; Amon and Farrell, 2005). Nach der erfolgreichen Bekämpfung eines Pathogens oder auch während einer chronischen Infektion enthalten die Wirte relative große Populationen von pathogen-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen, die in den SLO oder im nicht-lymphoiden Gewebe zirkulieren (Waller *et al.*, 2008). Die Gedächtnis-T-Zellen, die in den sekundären lymphatischen Organen (SLO) patrouillieren (central memory T cells, T<sub>CM</sub>), sind im Blut, dem lymphatischen Gewebe und den verschiedenen SLO vertreten (Waller *et al.*, 2008). Die nicht-lymphatischen Gedächtnis-T-Zellen T<sub>EM</sub> hingegen patrouillieren im Blut, der Lymphe und den nicht-lymphatischen Organen (Appay *et al.*, 2002). T<sub>CM</sub> exprimieren Lymphknoten-Homing-Rezeptoren (CD62L und "chemokine receptor" (CCR)7), währenddessen T<sub>EM</sub> Molekül-Rezeptoren für nichtlymphatisches peripheres Gewebe im Sinne von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine und CCR1-, CCR3- und CCR5-Chemokine-Rezeptoren besitzen (Waller *et al.*, 2008; Gillespie *et al.*, 2000; Appay *et al.*, 2002).

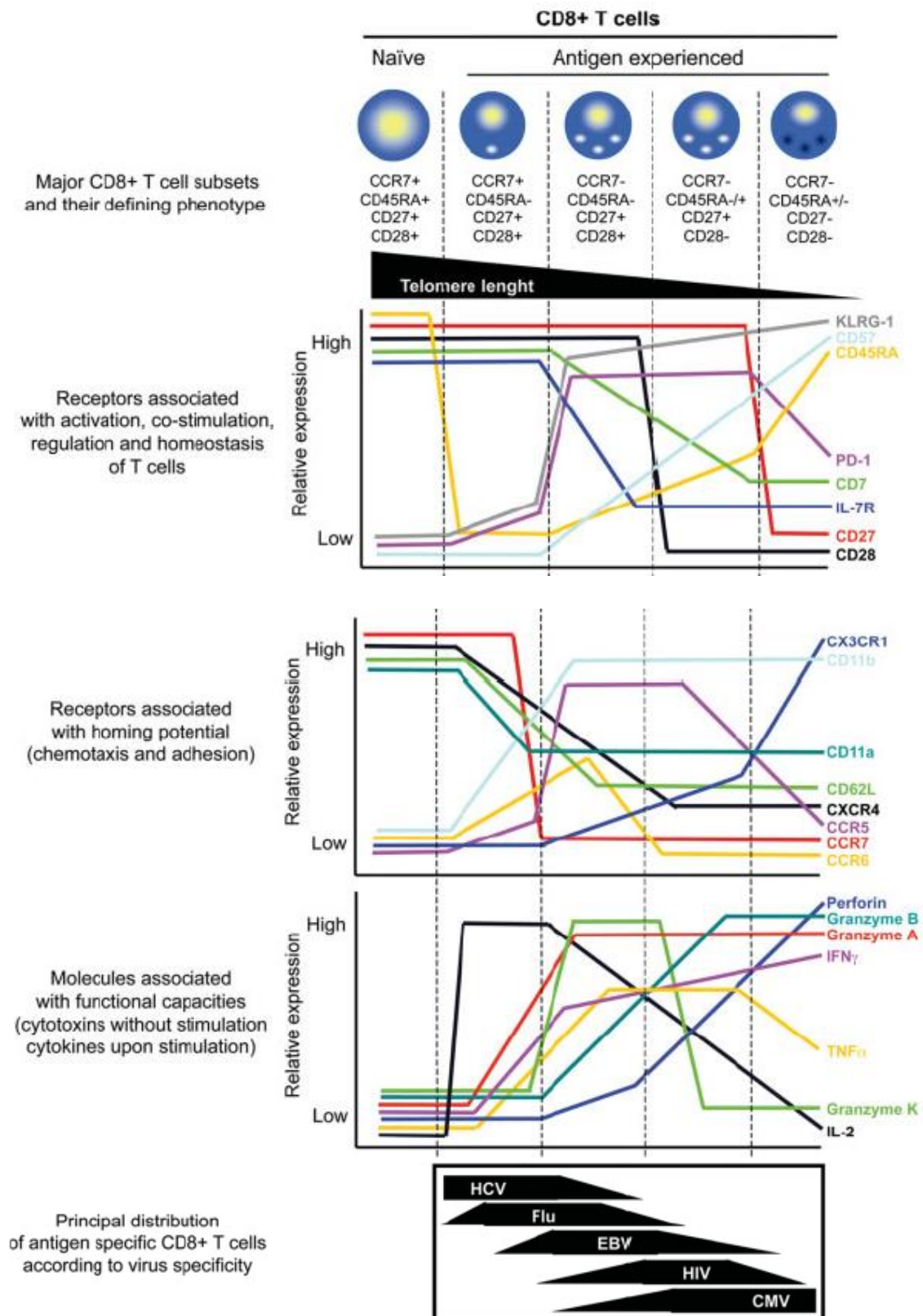


Abbildung 7; Darstellung der einzelnen Subtypen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Appay et al., 2008)

#### 1.5.4 Effekt von neuroendokrinen Faktoren auf die Immunzelladhäsion

Die in den letzten zwanzig bis dreißig Jahren durchgeführten immunologischen Studien konnten den wichtigen Part der Integrin-vermittelten Adhäsion bei Rezirkulation, Rekrutierung, Ansässigkeit und der Ausbildung der Immunologischen Synapse im Rahmen der T-Zell-Immunantwort belegen (Dustin, 2014; Springer and Dustin, 2012; Burbach *et al.*, 2007; Grakoui *et al.*, 1999; Goldstein *et al.*, 2000; Dimitrov *et al.*, 2019). Jedoch war es nicht bekannt, ob die Adhäsion von Immunzellen auch von anderen systemwirksamen Molekülen beeinflusst wird, wie zum Beispiel den  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoragonisten, deren Konzentrationen zum Beispiel während des Schlafes reduziert sind (Dimitrov *et al.*, 2015). Eine sehr wichtige Entdeckung war die Rekrutierung von spätdifferenzierten Effektorzellen wie  $T_{EM}$  und  $\gamma/\delta$   $CD8^+$  T Zellen, sowie zytotoxischen T-Zellen und  $CD16$ -Monozyten in die Zirkulation aufgrund eines Katecholamin-Levelanstieges infolge von Stress, Tageszeit oder nach  $\beta_2$  – adrenerger Rezeptoragonist- Epinephrineinfusion (Dimitrov *et al.*, 2009; Dimitrov *et al.*, 2010; Lange *et al.*, 2010). Trotz allem war die theoretische Grundlage der Katecholamin-induzierten Mobilisation von Effektorzellen lange Zeit nicht vollständig differenziert. Chigaev *et al.* konnten erstmals für die Verbindung von Integrin-vermittelter Adhäsion und der Epinephrin-induzierten Mobilisation wichtige Hinweise liefern (Chigaev *et al.*, 2007; Chigaev and Sklar, 2012). Sie konnten in Studien an Monozyten zeigen, dass die CXCL12-Chemokin-assoziierte „very late antigen“ (VLA)4-Integrinaffinität von anti-adhäsiven Signalen durch  $G\alpha_s$ -gekoppelte (eine Untereinheit der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR), die den cAMP-abhängigen Signalweg induzieren) Rezeptoragonisten wie den  $H_2$ -histaminergen Rezeptoragonisten Amthamin und den  $\beta_{1/2}$ -adrenergen Rezeptoragonisten Isoproterenol abhängig ist (Chigaev *et al.*, 2008; Chigaev *et al.*, 2011). Im Verlauf zeigten Dimitrov *et al.*, dass alle mobilisierten Effektorzellen einen allgemeinen Rezeptorphänotyp besitzen (hohe Expressionsrate des Integrins LFA-1 und des Chemokinerezeptors CX3CR1), der *in vitro* die Adhäsion an aktivierte Endothel ermöglicht (Dimitrov *et al.*, 2010). Dieser Prozess wird von Epinephrin umgehend antagonisiert (Dimitrov *et al.*, 2010). Hierbei kann Epinephrin umgehend die Integrinaktivierung inhibieren um das Lösen und Ausströmen der Zellen in die Zirkulation zu ermöglichen (Dimitrov *et al.*, 2010). Es ist derzeit ungewiss, ob Signale der  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoren zur Herunterregulation der TCR-vermittelten Integrin-Aktivierung führen können und die Ausbildung der immunologischen Synapse

und Ansässigkeit der Gedächtnis-T-Zellen beeinflussen.  $G\alpha_s$ -gekoppelte Rezeptor-Signale beeinflussen die Zellimmunität (Lombardi *et al.*, 2001; Packiriswamy and Parameswaran, 2015). Mannigfaltige immunmodulatorische Effekte sind für die  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptor-Agonisten wie Katecholamine, Epinephrin und Norepinephrine, die  $PGE_2$  und  $PGD_2$  sowie für Adenosine, Histamin als auch Serotonin bekannt (Brudvik and Taskén, 2012; Bellinger *et al.*, 2008; Dimitrov *et al.*, 2019). Die Wirkung hängt hierbei von der Expression der entsprechenden Klassen der  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoren auf Immunzellen ab (Dimitrov *et al.*, 2019). Die  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoren üben mittels cAMP-Produktion einen inhibierenden Einfluss auf Proliferation, Zytokinproduktion und Zytotoxizität aus. Indes werden durch Agonisten von  $G\alpha_i$ - and  $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren entzündliche Effekte vermittelt (Brudvik and Taskén, 2012). Bedingungen mit niedrigen Konzentrationen an endogenen  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoragonisten wie Katecholaminen (Dimitrov *et al.*, 2015), Prostaglandinen (Haack *et al.*, 2009) und Serotonin (Davies *et al.*, 2014) verbessern möglicherweise die adaptive Immunität, verbunden mit einem verbessertem Immun-T-Zellgedächtnis (Lange *et al.*, 2011; Dimitrov *et al.*, 2019).

## 1.6 Fragestellungen und Hypothesen

Unter der Bedingung Schlaf weisen die  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoragonisten, zum Beispiel Katecholamine (Dimitrov *et al.*, 2015), Prostaglandine (Haack *et al.*, 2009) und Serotonin (Davies *et al.*, 2014), niedrige Level auf. In vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoragonisten Norepinephrin, Epinephrin, Isoproterenol,  $PGE_2$ ,  $PGD_2$  und Adenosin dosisabhängig die Integrinaktivierung von CMV- und EBV-spezifischen T-Zellen inhibieren. Von diesen Erkenntnissen ausgehend, soll die vorliegende Arbeit darüber Aufschluss geben, ob unter der Bedingung Schlaf die Integrinaktivierung von CMV- und EBV-spezifischen T-Zellen verändert ist. Aufgrund der circadianen Rhythmik von Katecholaminen (Dimitrov *et al.*, 2015), Prostaglandinen (Kamperis *et al.*, 2004), Serotonin (Davies *et al.*, 2014) und Adenosin (Chagoya de Sanchez *et al.*, 1983) soll die Adhäsion einen kompletten Tag gemessen werden, um eine mögliche circadiane Rhythmik zu demaskieren. Zudem konnten die bisherigen Studien nachweisen, dass die spätdifferenzierten CMV-spezifischen T-Zellen am stärksten auf den Einfluss von Epinephrin reagieren und somit in den Blutkreislauf mobilisiert werden (Dimitrov *et al.*, 2010). Von Interesse ist, ob diese Subpopulation auch am sensitivsten auf die Integrinaktivierung reagiert.

Die folgend aufgeführten Fragenstellungen wurden formuliert:

1. Welches Verhalten zeigt die Integrinaktivierung unter Schlaf im Vergleich zu Schlafentzug?
2. Folgt die Integrinaktivierung einer circadianen Rhythmik?
3. Sind spätdifferenzierte CMV-spezifische T-Zellen am stärksten durch Schlaf beeinflusst?

Darauf basierend ergeben sich nachfolgende Hypothesen:

1. Unter physiologischen Bedingungen des Schlafes im Vergleich zum Schlafentzug findet sich eine höhere Integrinaktivierung.
2. Die Integrinaktivierung weist eine circadiane Rhythmik auf und nachts ihren Peak.
3. Spätdifferenzierte CMV-spezifische T-Zellen sind am sensitivsten.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Die Studienpopulation bilden zehn gesunde Probanden (fünf Frauen, fünf Männer) im Alter von 19-34 Jahren (MW = 24,7), die allesamt einen Body-Mass-Index (BMI) von 20-25 kg/m<sup>2</sup> (MW = 22,4) aufweisen. Weiterhin nimmt keiner der Probanden eine Dauermedikation, auch während der Versuche wurden keine Medikamente genommen. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass keiner der Teilnehmer Nachtarbeit verrichtet bzw. einer Tätigkeit mit Schichtdienst oder Nachtarbeitsanteil nachgeht. Ein weiteres Kriterium stellte dar, dass die Probanden Nichtraucher sind. Die Einnahme von Drogen wurde zum Ausschluss bzw. führte zur Nichtberücksichtigung. Zudem war Voraussetzung, dass die Probanden keine akuten oder chronischen Erkrankungen aufweisen. Die Grundlage für eine Teilnahme an der Studie bildete ein CMV-Nachweis sowie eine bestimmte HLA-Ausstattung (HLA-A2<sup>+</sup>), da nur bei gewissen HLA-Trägern der Nachweis CMV-spezifischer T-Zellen mittels Tetrameren möglich ist. Die Studie wurde vom Ethikkomitee der Universität Tübingen geprüft und zugelassen (Aktenzeichen: 642/2013BO2; im Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensbiologie vorliegend). Alle Probanden wurden über die Durchführung und die Risiken durch einen Arzt aufgeklärt und willigten schriftlich nach entsprechender Bedenkzeit in die Teilnahme gemäß der Deklaration von Helsinki ein.

Nach einer Voruntersuchung (Anamnese, körperliche Untersuchung, Blutdruck, Puls) zum sicheren Ausschluss akuter oder chronischer Erkrankungen samt Abnahme eines Routinelabors im Rahmen der Adaptionnacht und einer Versuchsnacht zur Gewöhnung an das Setting fanden zwei Sitzungen mit einem Mindestabstand von zwei Wochen im Schlaflabor statt, bei den Frauen zu vergleichbaren Zeitpunkten hinsichtlich ihrer Menstruation. Das Wohlbefinden als auch die Gesundheit der Teilnehmer wurde an jedem Termin ärztlicherseits und durch Fragebögen überprüft. Die beiden Sitzungen bestanden zum einen aus einer Versuchsnacht mit Schlafentzug in aufrecht sitzender Position, wobei eine Ablenkung durch Film schauen, Telefonate, Gespräche mit dem Versuchsleiter, Buch lesen oder Musik hören erlaubt war, und zum anderen aus der Versuchsnacht mit einem Schlafanteil von 23-7 Uhr. Bei beiden

Versuchseinheiten waren die Patienten von 7 Uhr bis 19 Uhr des Folgetages in der Versuchseinrichtung oder dem angrenzenden Gelände. Hierbei standen sie unter engmaschiger Supervision durch den Versuchsleiter. Um 8 Uhr wurde ein standardisiertes, vegetarisches Frühstück aus der Küche des Universitätsklinikums Tübingen serviert, um ca. 12:30 gab es ein vegetarisches Mittagessen in den Räumlichkeiten der nah gelegenen Universitätsklinik, ebenfalls aus der Küche des Universitätsklinikums Tübingen. Insgesamt dauerte eine Versuchsnacht von ca. 20 Uhr bis ca. 19 Uhr des Folgetages, wobei von 22 Uhr am ersten Tag beginnend alle vier Stunden bis 18 Uhr am zweiten Tag des Versuchs Blut aus einer Venenverweilkanüle („Vasofix“ mit Kanülengröße 18G der Firma Braun, Melsungen, Deutschland) abgenommen wurde. Ein Schema zu den Blutabnahmen liefert die Abbildung 8. Auf Seite 35 in Abbildung 9 ist der Versuchsaufbau der Bedingung „Schlaf“ schematisch abgebildet. Zwei Blutabnahmen in der Nacht wurden über ein dünnes Kabel in ein benachbartes Zimmer abgeleitet, sodass der Proband nicht gestört wurde. Das Blut wurde umgehend untersucht. Um ein mögliches Koagulieren des Blutes in der Leitung als auch in der Venenverweilkanüle zu verhindern, erhielten die Probanden nachts 0,9%-Natrium-Chlorid (NaCl)-Infusionen, zwischen 500 und 700 ml. Die ersten 7,5 ml der Blutprobe nachts wurden verworfen, bei der ersten Entnahme sowie den Proben von 10, 14 und 18 Uhr wurden jeweils die ersten 5 ml Blut verworfen. Insgesamt wurden den Probanden insgesamt ca. 480 ml Blut entnommen, verteilt auf zwei Versuchstage und eine Entnahme bei der Voruntersuchung. Um eine Aussage zur Tagesschläfrigkeit als auch der Schlafqualität – und Quantität treffen zu können, wurden den Patienten verschiedene Fragebögen ausgeteilt, zudem wurden mittels eines Schlaftagebuches außerordentliche Stressoren und ein ausgewogenes Schlafverhalten überprüft. Gleichermäßen fand eine Ableitung von EEG-, EOG- und EMG-Strömen statt.

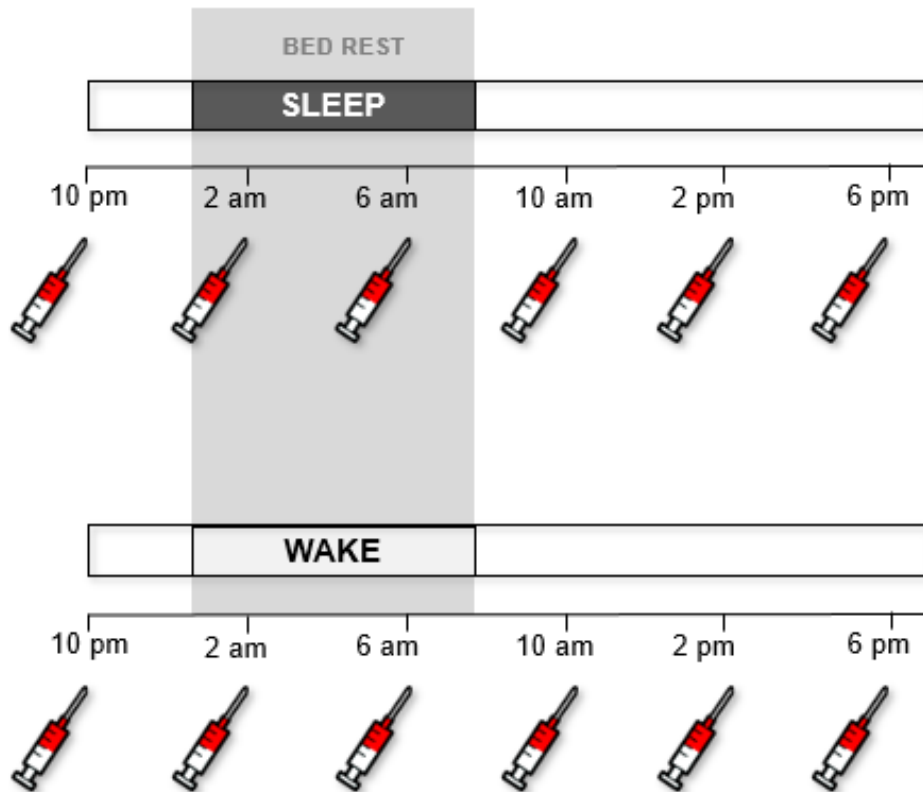


Abbildung 8; Schema der Blutentnahmen in den Bedingungen „Schlaf“ und „Wach“; Grau staffiert die Bettzeit (aus unserer Arbeitsgruppe)

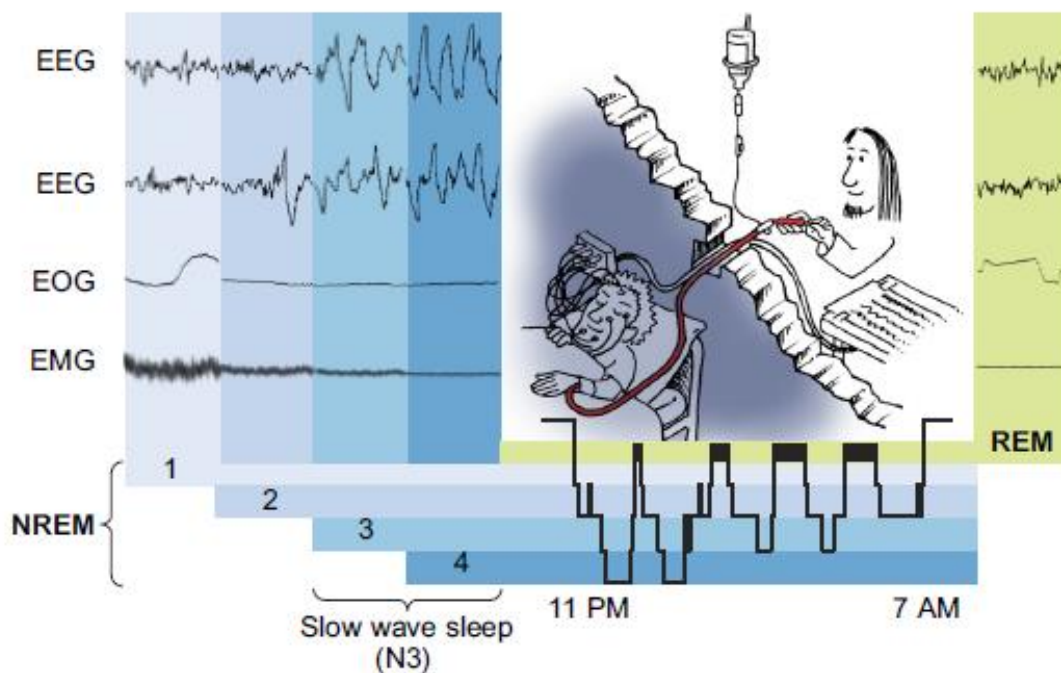


Abbildung 9; Darstellung der Blutentnahme unter Laborbedingungen sowie des Hypnogrammsettings, in Bezug auf die Uhrzeit; aus (Besedovsky et al., 2019)

## 2.2 pMHC und ICAM-1-Multimere

Wie schon im Paper von Dimitrov beschrieben (Dimitrov *et al.*, 2019), produzierten wir mittels konventioneller pMHC-Mehrmalsfaltung (Hadrup *et al.*, 2015) biotinylierte pHLA-A\*0201-Monomere (CMV A2/NLVPMVATV [A2/NLV] und EBV A2/GLCTLVAML [A2/GLC]). Weiterhin kreierten wir fluoreszierende pHLA-A\*0201-Multimere, indem wir Monomere mit Streptavidin-PE oder APC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) im Verhältnis 1:4 (Streptavidin:pHLA-A2-Monomer) inkubierten. Die Multimere wurden aliquotiert und bei -80°C in Trishydroxymethylaminomethan-gepufferter Salzpufferlösung, 16% Glycerol enthaltend, eingefroren (Hadrup *et al.*, 2015). Die schlussendliche Azid-Konzentration betrug 0,035%. Zudem stellten wir fluoreszierende ICAM-1/Anti-Fc-Multimerkomplexe her, indem wir 200 µg/ml rekombinantes humanes ICAM-1-Fc (Bengtsson *et al.*, 2013) mit polyklonalen anti-humanem Fc-FITC f(ab)<sub>2</sub>-Fragmenten (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) im molaren Verhältnis 1:4 (ICAM-1-Fc:IgG Teil von Anti-Fc-FITC-Fragmenten) bei 4°C für drei Stunden inkubierten. Wir lagerten die mICAM-1-Aliquots bei -20°C bis zur Verwendung, insgesamt weniger als eine Woche.

## 2.3 Zellstimulation und mICAM-1-Anfärbung

Verwendung fand ein kürzlich von unserer Gruppe entwickeltes FACS-Assay, dass mittels Vollblutmarkierung die  $\beta_2$ -Integrinaktivierung von Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen veranschaulichen kann (Dimitrov *et al.*, 2018). Dieses Assay misst die Integrinaktivierung anhand der spezifischen Zellbindung von ICAM-1, dass eine vermehrte Affinität und/ oder Avidität der  $\beta_2$ -Integrine nach TCR-induzierter Aktivierung widerspiegelt. Wie schon in dem Paper von Dimitrov dargelegt (Dimitrov *et al.*, 2019), inkubierten wir frisch heparinisiertes Vollblut (380 µl/test) für 5 Minuten im Wasserbad in 5 ml-Falcon-Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) bei 37°C mit 0,6 µg/ml CMV A2-NLV/PE- oder EBV A2-GLC/PE-Multimeren sowie 6,25 µg/ml mICAM-

1/FITC. Umgehend nach der Inkubation wurden die Proben fixiert, die Erythrozyten wurden mit FACS-Lyselösung (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), das 1 mM Calcium-Ionen und 2 mM Magnesium-Ionen enthält, lysiert. Anschließend wurde eine Waschung mit PBS (0.5% Albumin und 0.1% Natriumazid) durchgeführt (siehe bitte Abbildung 10).

Nach einer Zentrifugierung wurden die Zellen mit Oberflächenmarkern gefärbt, um CD8<sup>+</sup> T-Zellen und ihre Subpopulationen (früh- (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>); mittel (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>)- und spätdifferenziert (CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>)) zu erkennen. Die monoklonalen Antikörper CD4/BV421, CD3/BV510, CD8/BV605, CD28/PerCP-Cy5.5, CD27/APC, CD14/APC-Cy7, and CD19/APCCy7 (alle von BioLegend, San Diego, USA) wurden zu den Zellen hinzugefügt, insgesamt für 15 Minuten und bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Antikörper wurden bei vorgeprüften optimalen Konzentrationen eingesetzt. Die Proben wurden mittels eines LSR Fortessa (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) untersucht und mit der FACS DiVA Version 8.0 ausgewertet. Insgesamt wurden mindestens 50000 CD8<sup>+</sup> Ereignisse für das Antigen-spezifische Assay gezählt. Die Resultate werden in Relation der Zellen zur Gesamtpopulation oder anhand der „mean fluorescence intensity“ (MFI) der mICAM-1-Bindung an der Gesamtheit der pMHC<sup>+</sup>-Zellen dargestellt.

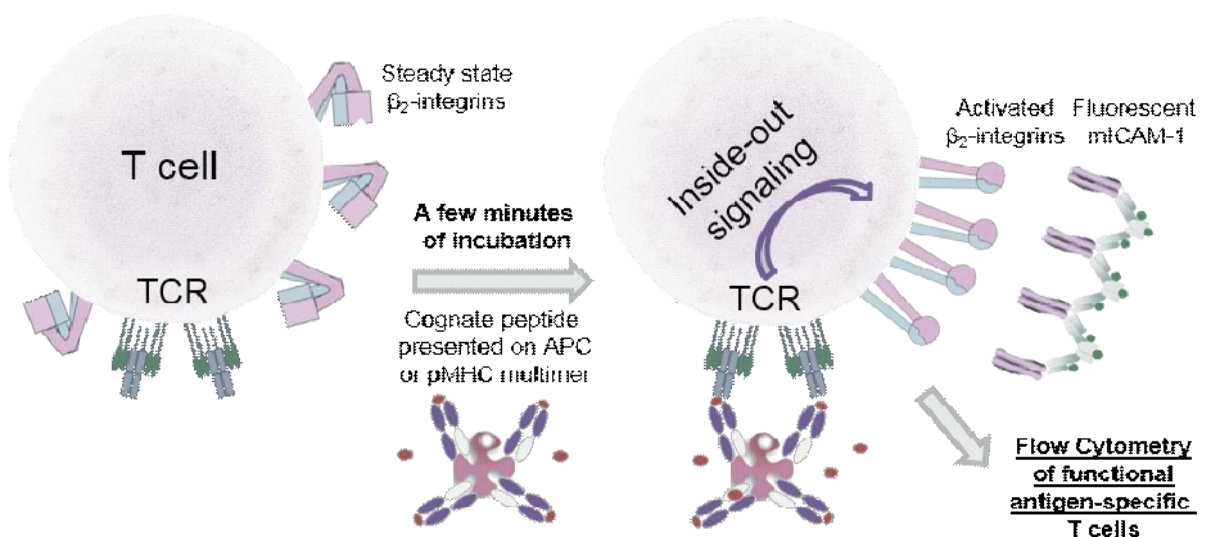


Abbildung 10; Arbeitsschritte im Rahmen der mICAM-1-Anfärbung; Interaktion TCR und CMV- bzw. EBV-spezifische Tetramere; aus unserer Arbeitsgruppe

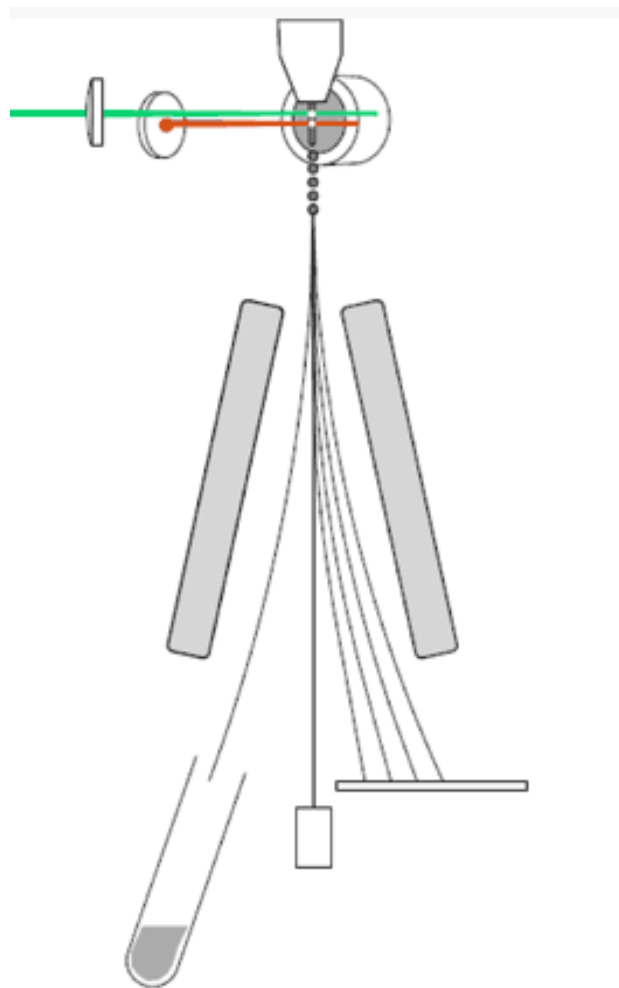
## 2.4 Evaluation des Schlafes

Mithilfe des EEG und der damit verbundenen Möglichkeit zur Aufzeichnung von Hirnströmen aufgrund von Potenzialschwankungen der kortikalen Neuronen ist es möglich, den Schlaf aufgrund spezifischer EEG-Muster in Schlafstadien aufzuteilen, siehe Abbildung 9. Anhand der Anzahl als auch der Dauer der durchlaufenen Schlafstadien kann auf einen erholsamen Schlaf geschlossen werden. Gleichermäßen wurden auch EOG und EMG abgeleitet. Zudem füllten die Probanden nach jeder Schlafnacht den Schlafragebogen Typ A (SF-A-R) aus, gaben zudem auf der Stanford-Schläfrigkeitsskala (SSS) ihren aktuellen Wert vor dem Zubettgehen (ca. 22 Uhr) und nach dem Aufwachen gegen ca. 7:30 Uhr. Zu den korrespondierenden Zeiten bei der Versuchsnacht mit Schlafentzug wurden die Werte der SSS ebenfalls bestimmt.

## 2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird als ein Messverfahren verstanden, das die Anzahl und bestimmte Eigenschaften von Zellen bestimmen kann. Untersucht werden zum Beispiel können die Genexpression, die Oberflächeneigenschaften, die intrazelluläre Proteinexpression und die Morphologie der Zellen (Ibrahim and van den Engh, 2007). Abbildung 11 zeigt eine mögliche Anordnung. Hierbei werden die Zellen einzeln und nacheinander durch eine Küvette aus Glas oder Quarz geleitet und passieren einen Laserstrahl oder mehrere Laserstrahlen. Die auftretenden Emissionen werden durch entsprechende Detektoren aufgezeichnet, unterschieden werden Vorwärts- und verschiedene Seitwärtsstreulichter. Je nach Eigenschaft und Größe der Zellen ergibt sich ein signifikantes Bild anhand der Streulichter. Zur weiteren Differenzierung von Zellen können diese fluoreszenzmarkiert werden und somit können Zellen eines Typs gleichsam in entsprechende Gruppen sortiert werden. Mittels der Antigen-Antikörper-Reaktion können über fluoreszenzgefärbte Antikörper intrazelluläre Proteine, Peptide, DNA oder Oberflächenmerkmale nachgewiesen werden. Diese Methode wird auch als

Fluoreszenz-Durchflusszytometrie bezeichnet. Das von uns verwendete Gerät lautet LSR Fortessa der Marke BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland), die entsprechende Analysesoftware war FACE DiVA 8.0. Insgesamt wurden mehr als 50000 CD8<sup>+</sup> Ereignisse für das Antigen-spezifische Assay gesammelt. Die Ergebnisse werden als relativer Anteil in Bezug auf die Gesamtpopulation dargestellt, und als MFI der mICAM-1-Bindung in Bezug auf alle pMHC<sup>+</sup>-Zellen.



*Abbildung 11; Schematische Darstellung eines FACS-Gerätes: im Bild oben zu sehen ist die Öffnung, durch die die zu untersuchende Flüssigkeit fließt. Die Flüssigkeit wird in der Folge von einem oder mehreren Laserstrahlen getroffen. Fluoreszenz und Streulicht werden durch eine Objektivlinse aufgenommen und verarbeitet. Mittels Magnetfeld kann die gewünschte Material isoliert und weiter untersucht werden; aus (Ibrahim and van den Engh, 2007)*

## 2.6 Statistik

Alle Daten werden als Mittelwert samt entsprechendem Standardfehler aufgelistet. Zur Auswertung der Stanford-Schläfrigkeits-Skala und der SF-A-R- Fragebögen wurden die Antworten mit Microsoft® Excel® 2016 MSO (16.0.10325.20082) gemittelt und in entsprechenden Diagrammen dargestellt. Die statistische Analyse basiert auf der Varianzanalyse mit Messwiederholungen (ANOVA) mit folgendem Post-hoc-Test. Die beiden Experimentalbedingungen „Schlaf“ und „Schlafentzug“ stellen die ANOVA-Faktoren dar. Eine Periode besteht aus Tag und Nacht. Die Zeit wird durch die einzelnen Zeitpunkte mit einem jeweiligen Abstand von vier Stunden nachts (22 Uhr bis 6 Uhr morgens) als auch tagsüber (10 Uhr tagsüber bis 18 Uhr abends) dargestellt. Die Unterschiede zum Zeitpunkt des Nullpunktes (22 Uhr) zwischen „Schlaf“ und „Schlafentzug“ wurden als Kovariante genutzt, um die Korrektur der tagtäglichen Abweichung der Immunparameter darzustellen. Mittels der Greenhouse-Geisser-Methode wurden die Freiheitsgrade bereinigt. Um im Rahmen der beiden Bedingungen entsprechende Rhythmen ausfindig zu machen, fand das Programm Chronolab® für eine Cosinor-Analyse in Bezug auf eine Periode von 24 Stunden Verwendung.



### 3 Resultate

#### 3.1 Schlaf der Studienteilnehmer

Bei allen Probanden fand eine EEG-Aufzeichnung während der Schlaf- Bedingung statt. Aufgrund von technischen Problemen wurden nur drei von zehn Probanden-EEGs beurteilt. In diesen drei Fällen wurde aber eine gute Schlafqualität konstatiert.

Schlafstadium	Dauer in [min]	SEM in [min]
Wach	9,33	6,34
S1	50,67	8,61
S2	251,83	15,84
S3	62,67	31,04
S4	25,83	
REM	84,67	4,32
Bewegung	0,83	
Total	459,67	11,80

*Tabelle 1; Durchschnittliche Dauer der Schlafphasen der drei EEGs samt Abbildung des durchschnittlichen Standardfehlers. Anhand der zeitlichen Verteilung der einzelnen Schlafphasen sowie geringer Bewegungs- und Wachanteile kann von einer guten Schlafqualität ausgegangen werden.*

Zudem wurde der Schlaf anhand der Fragebögen SSS und SF-A-R beurteilt. In Abbildung 12 ist ersichtlich, dass der SSS-Wert nach der Schlafnacht um 0,5 Punkte auf 2,7 Punkte sank und korreliert somit mit einer soliden Schlafqualität (siehe Abbildung 14).

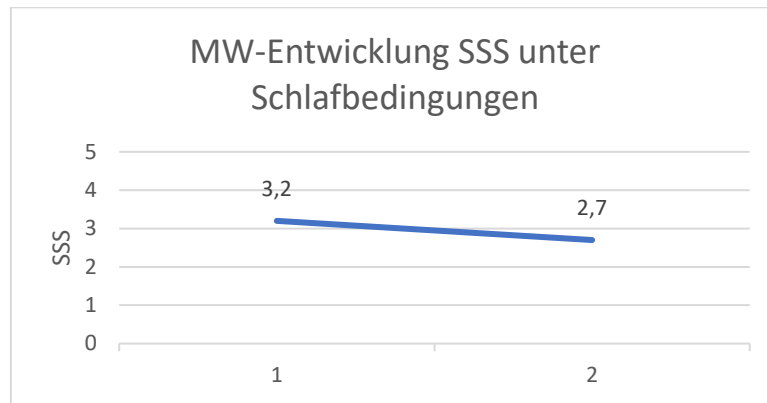


Abbildung 12; Mittelwert (MW) -Entwicklung des Wertes der Stanford-Schlufigkeits-Skala (SSS) unter standardisierten Schlafbedingungen

In der „Wach“-Bedingung wurden die Studienteilnehmer engmaschig kontrolliert, um ein Einschlafen zu verhindern. Hierbei kann konstatiert werden, dass die Auswertung der Stanford Schlufigkeits-Skala unter der Bedingung Schlafentzug einen durchschnittlichen Anstieg von 1,4 auf 4,3 Punkte ergab. Damit kann von einer Zunahme der Schlufigkeit ausgegangen werden.

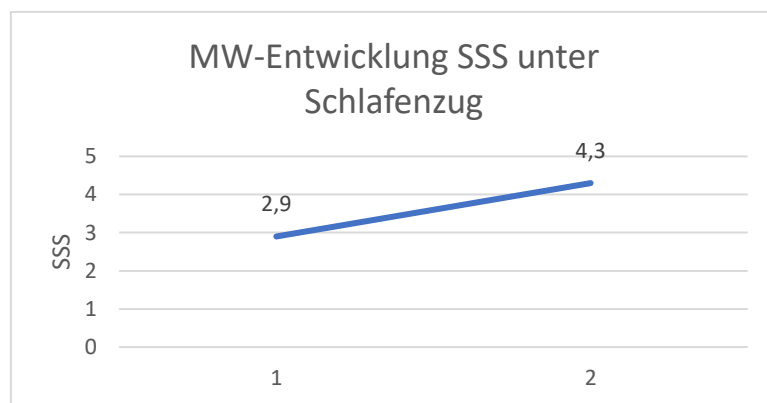


Abbildung 13; Mittelwert (MW) -Entwicklung des Wertes der Stanford-Schlufigkeits-Skala (SSS) unter Schlafentzug

Zur besseren Beurteilung und Differenzierung des Schlafes erfolgte zudem die Auswertung der SF-A-R, siehe bitte Abbildung 14. Hierbei ergaben sich folgende Aussagen: Den Schlaf per se beurteilten 70% als wenigstens „mittel gut“ (20% sehr gut, 20% ziemlich gut), die restlichen 30% bewerteten mit „wenig gut“. Als wenigstens „mittel tief“ wurde er von 70% eingestuft (20% „ziemlich tief“), auf die Einstufungen „wenig tief“ und „nicht tief“ entfielen 20% respektive 10%. Alle Probanden empfanden den Schlaf als wenigstens „mittel entspannt“, wobei insgesamt 40% „ziemlich entspannt“ wählten. Zudem wurde nach dem Befinden vor dem Zubettgehen gefragt. Hier äußerten sich 90% mit „mittel schlafbedürftig“ (insgesamt 30% „sehr“ und 40% „ziemlich schlafbedürftig“), ein Proband wählte „wenig schlafbedürftig“. Als entspannt bezeichneten sich zu diesem Zeitpunkt alle Studienteilnehmer (10% „sehr“; 70% „ziemlich“ und 20% „mittel“). 70% wählten „wenig“ oder „nicht überfordert“, jeweils 10% entfielen auf die Möglichkeiten „ziemlich“ und „mittel überfordert“.

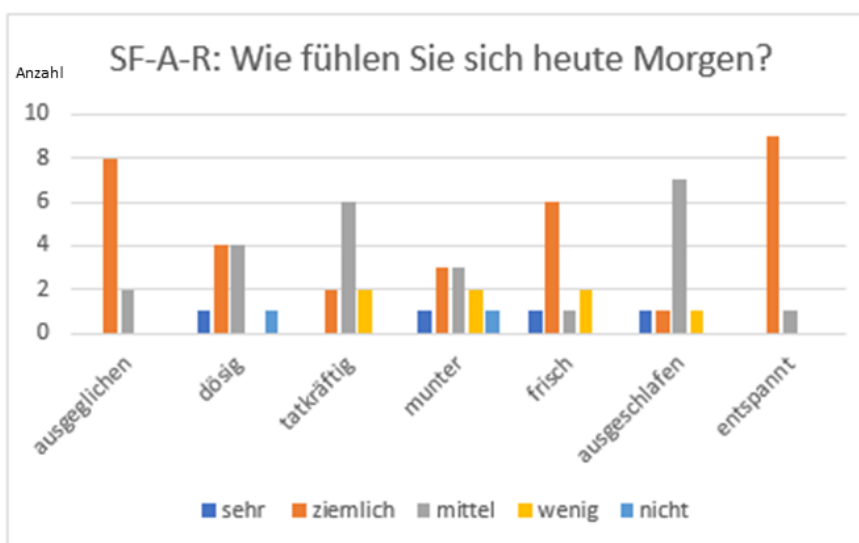
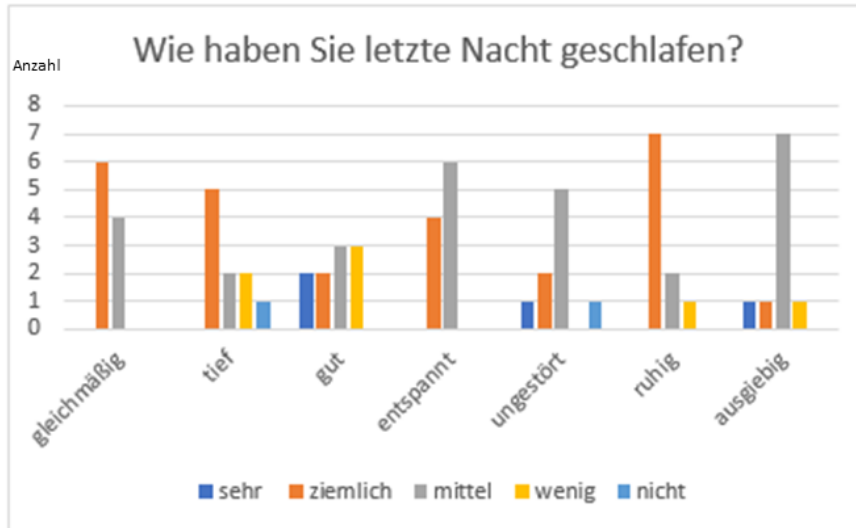


Abbildung 14; SF-A-R: Auswertung zum Befinden der Probanden

Eine weitere Frage stellte das Befinden am Morgen nach der Schlafnacht in den Fokus. Die Antwortmöglichkeit „ausgeglichen“ wurde von allen Probanden mit wenigstens „mittel“ ausgewählt, insgesamt acht Studienteilnehmer stufen sich als „ziemlich ausgeglichen“ ein. „Entspannt“ fühlten sich zudem alle Probanden mit wenigstens „mittel“, 90% sogar „ziemlich entspannt“. Insgesamt bezeichneten sich 90% als wenigstens „mittel ausgeschlafen“ (jeweils 10% „sehr“ und „ziemlich“). Ein Proband stufte sich als „wenig ausgeschlafen“ ein.

Unter den Probanden ergab sich eine mittlere Einschlafzeit von 22 Minuten, darunter ein Proband mit 60 Minuten. Als Ursachen dafür wurden ungewohnte Schlafumgebung und Beschäftigung mit Tagesereignissen genannt. Außerordentliche akute oder chronische Stressoren wurden nicht angegeben. 70% der Probanden konnten keine Bildeindrücke während des Einschlafens angeben, die restlichen 30% wählten „nicht sicher“. 40% gaben hierbei „leichte“ Muskelzuckungen, der Rest der Studienteilnehmer nahm keine besonderen Muskelaktivitäten wahr. Die Probanden wachten durchschnittlich 2,6 Mal auf und schliefen im Mittelwert nach ca. sieben Minuten wieder ein. Insgesamt ist bei einer Abnahme des SSS-Wertes sowie bei einer durchschnittlichen guten Beurteilung des Schlafes von guten Schlafbedingungen und somit einem erholsamen Schlaf auszugehen.

### **3.2 Gating von CMV- und EBV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Beurteilung der $\beta_2$ -Integrin Aktivierung mittels Markierung mit mICAM-1**

Um die Integrinaktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu messen, wurden die Lymphozyten gemessen und subspezifiziert. Mittels FACS-Analyse wurden die Lymphozyten entsprechend einem Gating unterzogen und anschließend initial bezüglich der Gesamtanzahl beurteilt. Im Verlauf wurde die MFI der ICAM-1-Bindung an aktivierte Integrine gemessen.

Die auf der nachfolgenden Seite folgende Abbildung 15 zeigt anhand eines Dichtediagramms nach FACS-Analyse die Auftrennung der Lymphozyten spezifisch nach CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Sämtliche Zellen des Vollblutes der Probanden wurden 5

Minuten bei 37°C in Gegenwart von von pMHC-Multimeren (A2-NLV/PE oder A2-GLC/PE) und mICAM-1 inkubiert.

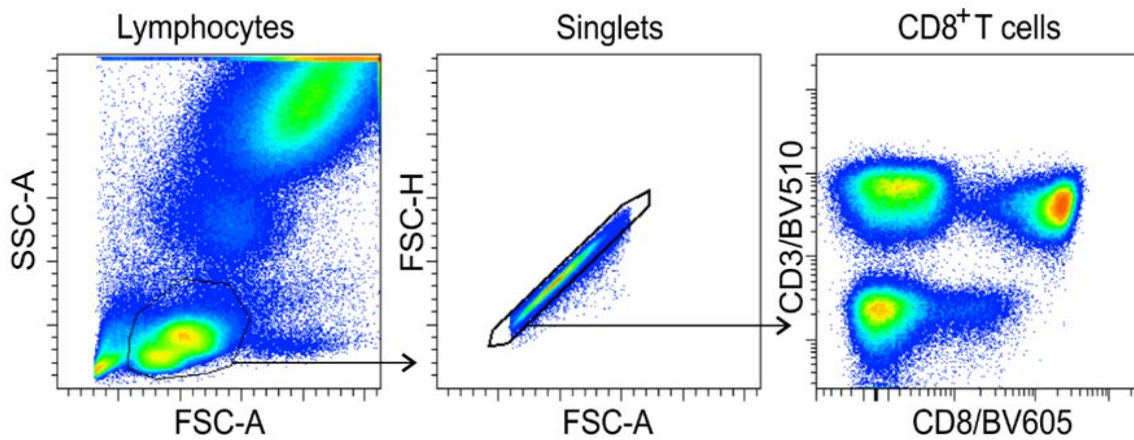


Abbildung 15; FACS-basierte Analyse und Gating der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels Dichtediagramm; links das Lymphozyten-Gate, mittig der Ausschluss von „height duplet“ samt front scatter area; rechts CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen; aus unserer Arbeitsgruppe

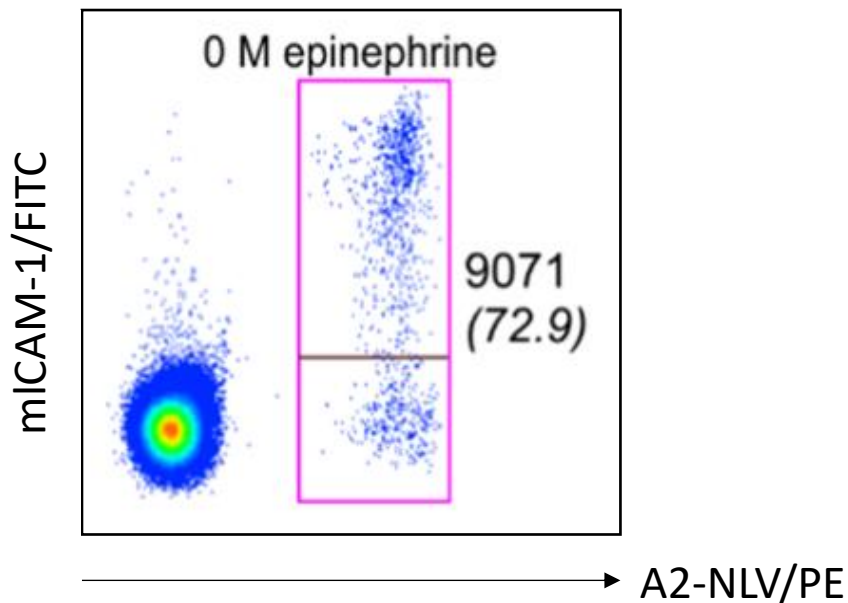


Abbildung 16; FACS-basierte Analyse und Darstellung von CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen unter Abwesenheit von Epinephrin eines repräsentativen Probanden; MFI der mICAM-1-Bindung von A2-NLV<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei 9071; in Klammern und in Kursivschrift die Häufigkeit der mICAM-1<sup>+</sup>-Zellen unter den A2-NLV<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (72,9); aus unserer Arbeitsgruppe

Abbildung 16 veranschaulicht die CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Anfärbung mit mICAM-1 und A2-NLV/PE eines repräsentativen Probanden. Die entsprechende Blutabnahme wurde zur Basislinie 22 Uhr abgenommen. Die Bindung des Multimers an den TCR führt zur  $\beta_2$ -Integrinaktivierung, was anhand der Markierung mit mICAM-1 nachgewiesen werden kann. Insgesamt lag der MFI bei 9071, die Häufigkeit der mICAM-1<sup>+</sup>-Zellen unter den A2-NLV<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen ergab 72,9, sodass das insgesamt mehr als zwei Drittel der Zellen mICAM-1<sup>+</sup> waren.

Abbildung 17 zeigt die EBV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Anfärbung mit mICAM-1 und EBV-Multimer A2-GLC/PE eines repräsentativen Probanden. Gleichermaßen führt die Bindung des Multimers an den TCR zur  $\beta_2$ -Integrinaktivierung, was anhand der Markierung mit mICAM-1 nachgewiesen werden kann. Insgesamt lag der MFI bei 1877, die Häufigkeit der mICAM-1<sup>+</sup>-Zellen unter den A2-GLC<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen ergab 56,1, sodass das insgesamt mehr als die Hälfte der Zellen mICAM-1<sup>+</sup> waren.

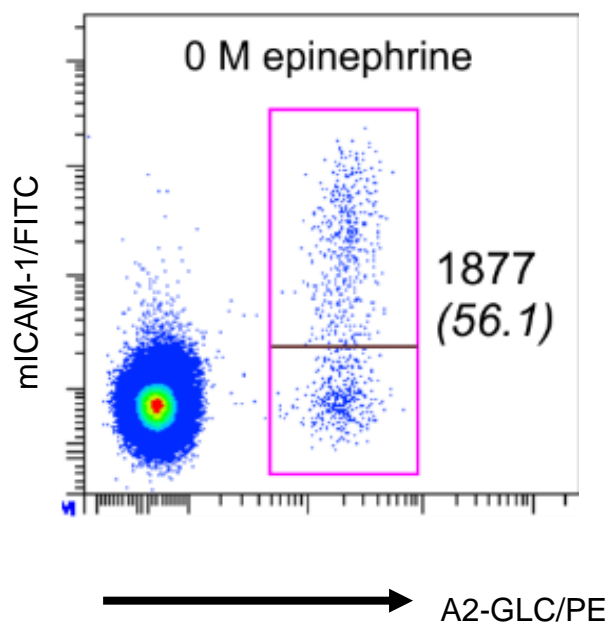


Abbildung 17; FACS-basierte Analyse und Darstellung von EBV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen unter Abwesenheit von Epinephrin; MFI der mICAM-1-Bindung von A2-GLC<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei 1877; in Klammern und in Kursivschrift die Häufigkeit der mICAM-1<sup>+</sup>-Zellen unter den A2-GLC<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (56,1); aus unserer Arbeitsgruppe

### 3.3 Schlaf erhöht die $\beta_2$ -Integrin Aktivierung von CMV- und EBV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Anhand der Tatsache, dass Schlaf durch niedrige Konzentrationen an  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoragonisten wie Katecholaminen, Prostaglandinen und Histamin gekennzeichnet ist, wurden die Effekte von Schlaf und Schlafentzug auf die  $\beta_2$ -Integrin Aktivierung von CMV- und EBV-spezifischen T-Zellen verglichen. Über 24 Stunden wurde die Integrinausschüttung gemessen, um zudem eine circadiane Rhythmik zu demaskieren. Die MFI der mICAM-1-Expression bezüglich pMHC<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird unter der Bedingung „Schlaf“ im Vergleich zur Bedingung „Schlafentzug“ deutlich erhöht. Der Anstieg ist nicht über die gesamte Schlafphase nachweisbar ( $F(1.9) = 4.1$ ;  $p < 0.05$   $F(1.8) = 6.0$ ;  $p < 0.05$  für Schlaf/Wach-Zustand x Periodeneffekt für CMV- und EBV-spezifische T-Zellen; siehe Abbildung 18). Für die Zeitpunkte „2 Uhr nachts“ (CMV-spezifische T-Zellen) und „6 Uhr morgens“ (EBV-spezifische T-Zellen) konnte jedoch anhand eines „Followup-t-Testes“ ein signifikanter Anstieg errechnet werden (\* in Abbildung 18a) bzw. 18b)). Mittels einer Kosinoranalyse konnte für die mICAM-1-Expression der CMV- und EBV-spezifischen T-Zellen während einer normalen Zyklusfolge von Schlaf und Wachzustand eine circadiane Rhythmik detektiert werden ( $p \leq 0.023$ ; siehe bitte Abbildung 18). Unter der Kondition „Schlafentzug“ war keine circadiane Rhythmik nachweisbar ( $p < 0.07$  für CMV-spezifische T-Zellen;  $p < 0.10$  für EBV-spezifische T-Zellen). Für CMV- und EBV-spezifische T-Zellen fand sich mittels einer angepassten Kosinuskurve ein Gipfel bezüglich der mICAM-1-Expression um 3:33 Uhr  $\pm$  32 Minuten (min) bzw. 4:15 Uhr  $\pm$  50 min.



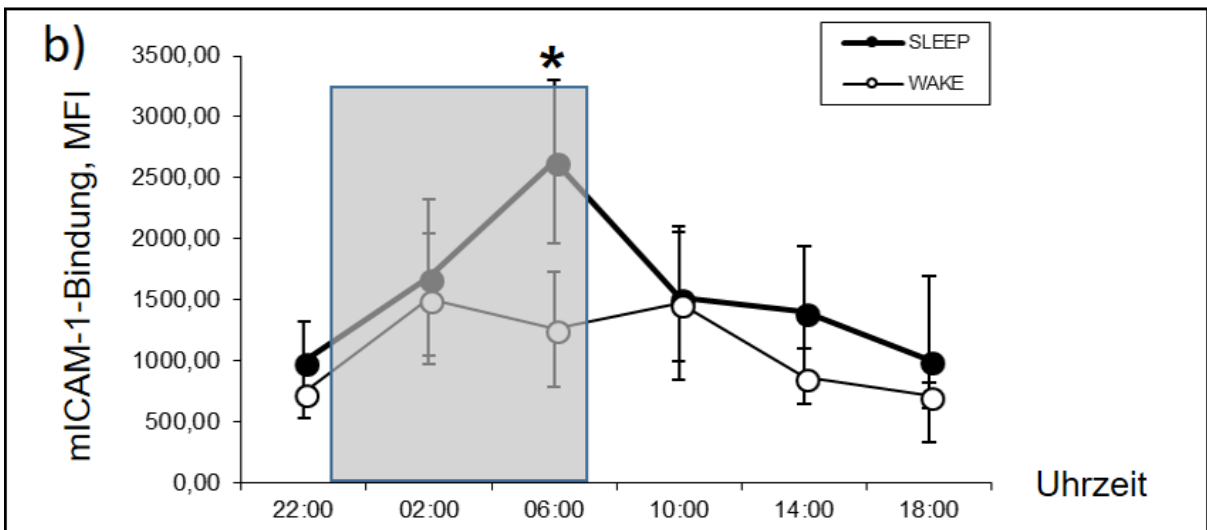
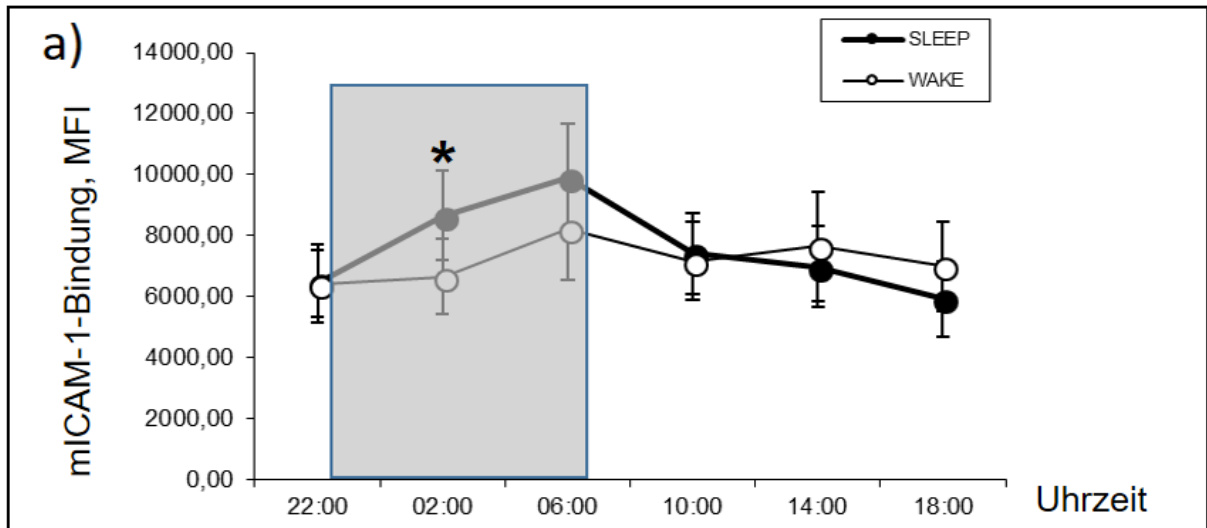


Abbildung 18; Schlaf erhöht die  $\beta_2$ -Integrin-abhängige Aktivierung von Antigen-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen.  $N = 10$ ,  $p < 0.05$ . a) MFI der mICAM-1-Expressionslevel von CMV-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen b) MFI der mICAM-1-Expressionslevel von EBV-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen; die grau schattierte Fläche symbolisiert die Bettzeit der Probanden; \* für Signifikanz gemäß eines Vergleiches der beiden Konditionen unter Verwendung eines paarigen  $t$ -Testes nach signifikanten ANOVA-Ergebnissen; nach (Dimitrov et al., 2019)

### **3.4 Gating der Subpopulationen von CMV- und EBV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Beurteilung der $\beta_2$ -Integrin Aktivierung mittels Markierung mit mICAM-1**

Anschließend wollten wir die Integrinaktivierung der Subpopulationen der CMV-spezifischen T-Zellen beurteilen, sodass wir die Gesamtpopulation in drei Subpopulationen teilten.

Sämtliche Blutzellen wurden in Ab- oder Anwesenheit von  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoragonisten bei den eingefügten Konzentrationen für fünf Minuten präinkubiert und folgend mit CMV-A2-NLV/PE-Multimeren und mICAM-1 für fünf Minuten bei 37°C markiert, dargestellt in Abbildung 19. Teil A zeigt die Differenzierung der Subpopulationen der pMHC<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Markieren mit CD27 und CD28 Antikörpern. Die Zahlen geben Aufschluss über die jeweilige Häufigkeit. Die CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen lassen sich anhand ihrer Differenzierung in früh- (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>), mittel- (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) und spätdifferenziert (CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>) unterteilen. Jeder Differenzierungstyp hat ungefähr einen Anteil von einem Drittel an der Gesamtheit der spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Teil B präsentiert Beispiele von mICAM-1-markierten Zellen für früh- (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>; links), mittel- (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>; mittig) und spät- (CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>; rechts) differenzierten CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Zahlen stehen für die MFI der mICAM-1-Expressionslevel von CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und ergeben hier 7250 für früh-, 10647 für mittel- und 11163 für spätdifferenzierte CMV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Häufigkeit der mICAM-1<sup>+</sup>-Zellen unter den entsprechenden CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen ergab bei allen ungefähr 73 und somit einen hohen Wert. Gleichermäßen wurden die EBV-spezifischen T-Zellen anhand der Marker CD27 und CD28 differenziert. Hierbei repräsentiert der frühdifferenzierte Phenotyp (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) circa 80% bis 90% der Gesamtheit, sodass die beiden anderen Populationen klein waren und keine mICAM-1-Markierung der EBV-spezifischen T-Subpopulationen gemessen werden konnten.

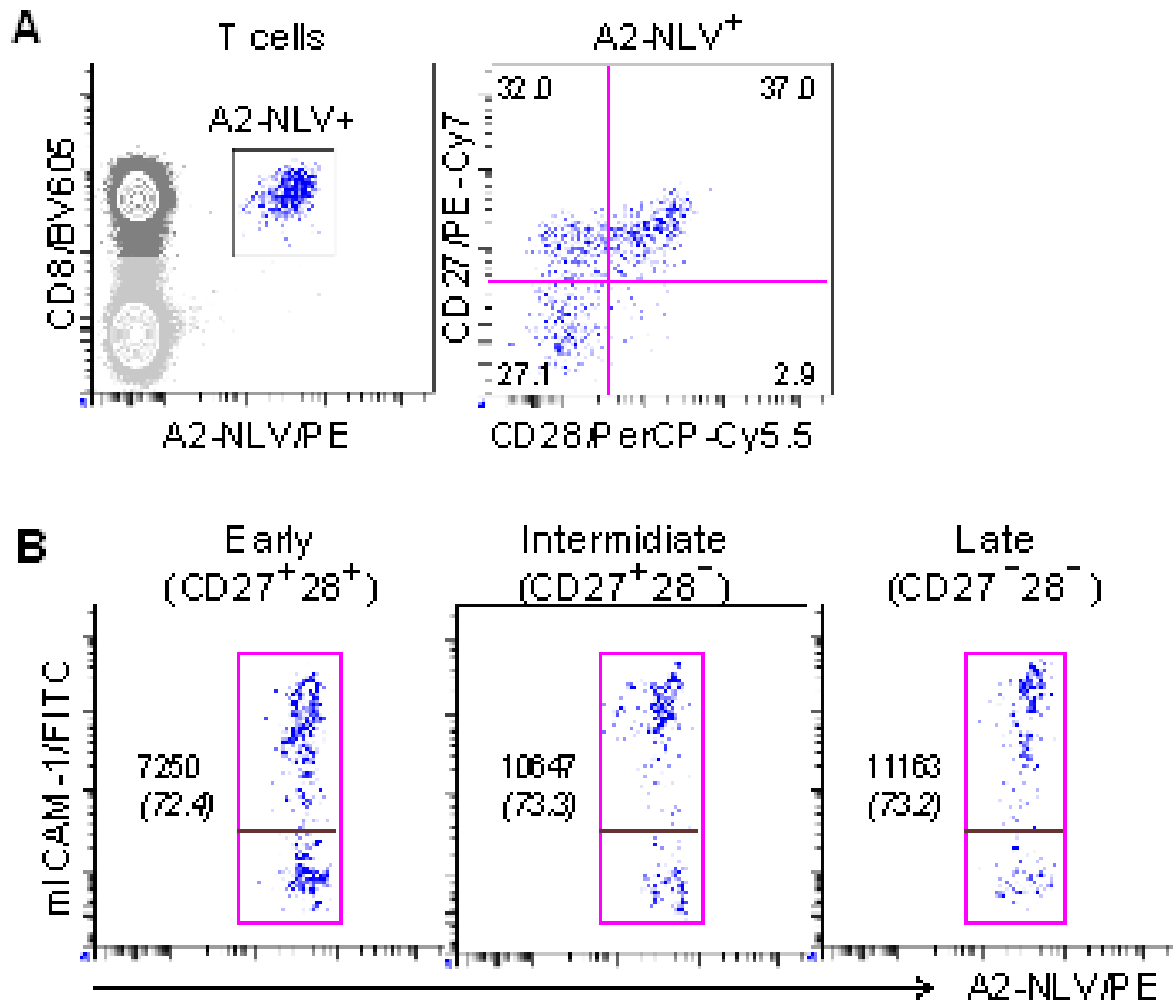


Abbildung 19; Effekt von  $\beta_2$ -AR-Agonisten auf pMHC-induzierte  $\beta_2$ -Integrin-Aktivierung von CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen; a) Differenzierung der pMHC<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen mithilfe der Markierung von CD27 und CD28; b) Aufteilung gemäß den einzelnen Subpopulation von CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in früh-, mittel- und spätdifferenziert, (Dimitrov et al.; 2019)

### 3.5 Schlaf erhöht selektiv die $\beta_2$ -Integrin Aktivierung von früh- und mitteldifferenzierten CMV-spezifischen T-Zellen

Zur Basislinie 22 Uhr findet sich für die mICAM-1-Expressionslevel in den Bedingungen Schlaf und Schlafentzug der niedrigste Wert für die frühdifferenzierten CMV-spezifischen Zellen ( $3889 \pm 570$ ), etwas höher fällt der Wert für den mitteldifferenzierten Subtyp aus ( $7479 \pm 1055$ ), während die höchsten

Expressionskonzentrationen für den spätdifferenzierten Typ ( $8868 \pm 1155$ ) gefunden wurden ( $p \geq 0.03$  für die Vergleich früh- gegen mittel-, früh- gegen spät- und mittel- gegen spätdifferenzierte Zellen).

Der Vergleich der Bedingungen „Schlaf“ und „Schlafentzug“ ergibt einen erheblichen Anstieg der mICAM-1-Expressionslevel der pMHC<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Kondition „Schlaf“ für den früh- und mitteldifferenzierten Typ ( $F(1,9) = 7.7$ ;  $p < 0.02$   $F(1,9) = 4.6$ ;  $p < 0.05$  für Schlaf/Wach-Zustand x Periodeneffekt für früh- (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) bzw. mitteldifferenzierte T-Zellen (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>); siehe Abbildung 20).

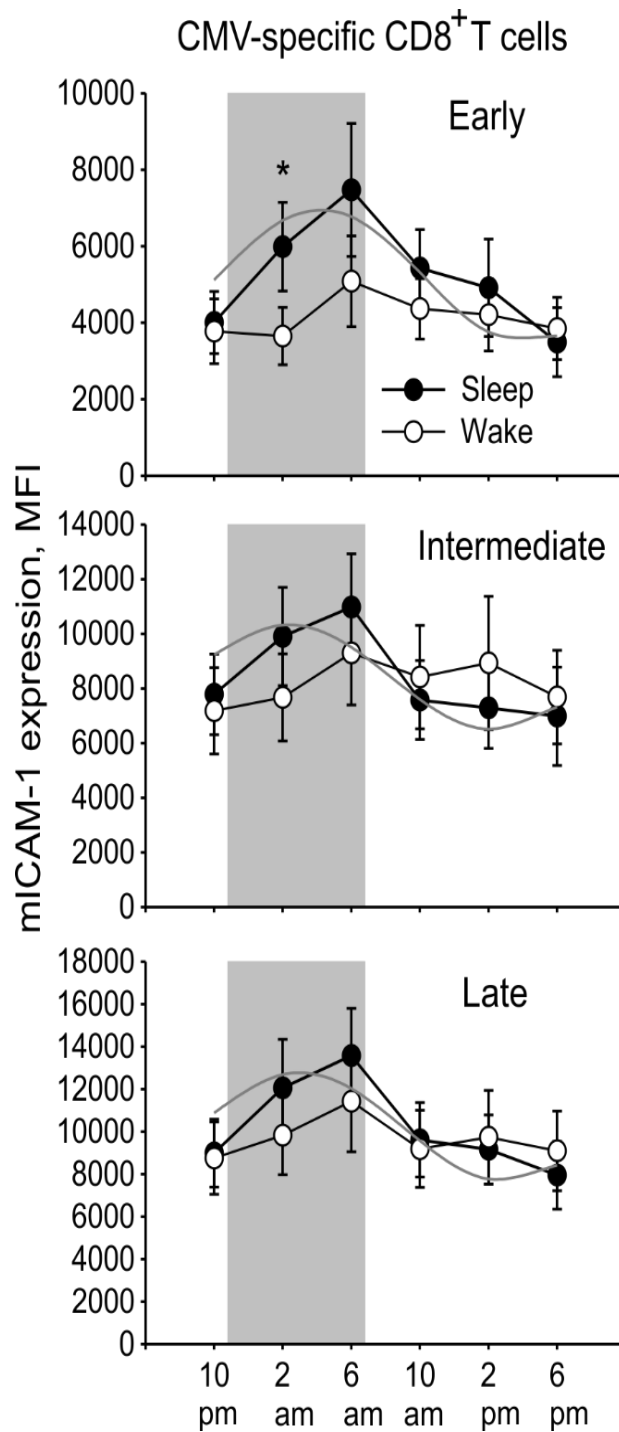


Abbildung 20; Schlaf erhöht die  $\beta_2$ -Integrin-abhängige Aktivierung von CMV-spezifischen Subpopulationen;  $n = 10$ ,  $p < 0.05$ ; Grau staffierte Fläche als Bettzeit der Probanden; Normaler Schlaf-Wach-Zyklus mit gefüllten Kreisen zu Zeiten der Blutabnahme, durchgehende Wachheit mit leeren Kreisen; die graue Linie (angepasst) als Korrelat einer circadianen Rhythmik; \* für Signifikanz gemäß eines Vergleiches der beiden Konditionen unter Verwendung eines paarigen  $t$ -Testes nach signifikanten ANOVA-Ergebnissen; (Dimitrov et al.; 2019)

Unter „Schlaf“ ergab der t-Test nur zur Uhrzeit einen signifikanten Wert für die fröhdifferentierten Zelltyp (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>). In der Bedingung „Schlaf“ waren die Spitzenwerte der mICAM-1-Expressionslevel deutlich höher im Vergleich zur Kondition „Schlafentzug“ ( $p \leq 0.01$ ), wobei bei allen drei Subpopulationen ähnliche Werte zu verzeichnen sind (57%, 57%, und 56% (von früh- zu spätdifferentiert)). Mithilfe einer Kosinoranalyse konnte für die mICAM-1-Expression aller drei Subpopulationen während einer normalen Zyklusfolge von Schlaf und Wachzustand eine circadiane Rhythmik detektiert werden ( $p \leq 0.033$ ; siehe bitte Abbildung 20), wobei der stärkste Rückgang der mICAM-1-Ausschüttung für den fröhdifferentierten Zelltyp gemessen werden konnte (bezogen auf die Spitzenwerte ergaben sich Reduktion der mICAM-1-Expression von 33%, 30% 26% für die drei Subtypen). Für fröhdifferentierte CMV-spezifische T-Zellen fand sich mittels einer angepassten Kosinuskurve ein Gipfel bezüglich der mICAM-1-Expression um 4:13 Uhr  $\pm$  84 min, um 3:01 Uhr  $\pm$  68 min für mitteldifferentierte CMV-spezifische T-Zellen und für spätdifferentierte CMV-spezifische T-Zellen um 2:19 Uhr  $\pm$  76 min.

## 4 Diskussion

Schlaf als Bedingung mit naturgemäß niedrigen Spiegeln von  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoragonisten (Katecholamine wie Epinephrin und Norepinephrin (Dimitrov *et al.*, 2015) und  $PGE_2$  (Haack *et al.*, 2009) begünstigt die TCR-induzierte Integrinaktivierung von CMV- und EBV-spezifischen T-Zellen, insbesondere die CMV-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen vom früh- ( $CD27^+CD28^+$ ) und mitteldifferenzierten ( $CD27^+CD28^-$ ) Subtyp. Hierbei fand sich in der Bedingung „Schlaf“ bezüglich der Integrinaktivierung ein Peak nachts, gleichermaßen ein Nadir tagsüber. In der Bedingung „Schlafentzug“ wurde solch eine Peak-Nadir-Verteilung nicht beobachtet. Bedenkt man die Bedeutung der TCR-induzierten  $\beta_2$ -Integrinaktivierung für die Ausbildung von Immunologischen Synapsen (Fooksman *et al.*, 2010; Abram and Lowell, 2009; Dustin and Springer, 1989; Dustin and Long, 2010; Long, 2011), legen unsere Daten nahe, dass Schlaf als Zustand mit niedrigen Konditionen an  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoragonisten sehr bedeutend für effektive T-Zell-Antworten ist.

Diese Ergebnisse lassen eine bedeutsame Rolle von Schlaf und mit diesem in Zusammenhang stehenden physiologischen Prozessen auf die Regulation von Immunantworten erahnen, die bisher unbekannt waren, zum Beispiel die Ausbildung von Immunologischen Synapsen durch T-Zell-Adhäsion zu APCs oder Zielzellen. Bisher existieren nur wenige Studien von der Existenz von anti-adhäsiven Faktoren, die in die Regulation der Immunzelladhäsion an das Endothel eingebunden sind. Epinephrin ist ein Mediator für die Rekrutierung von Effektorleukozytensubpopulationen in die Zirkulation, in dem es die Zelladhäsion zum Endothel reduziert. Beobachtet werden kann dieser Umstand während mentalem Stress, physischer Betätigung und während der Tagesstunden (Dimitrov *et al.*, 2010; Lange *et al.*, 2011; Dimitrov *et al.*, 2009). Bislang waren mechanistische Studien auf Monozyten begrenzt und zeigen deutlich, dass die schnelle Herabregulation der Chemokin-vermittelten Integrin-Aktivierung durch  $G\alpha_s$ -gekoppelte Rezeptoragonisten dieses Phänomen erklären (Chigaev *et al.*, 2011; Chigaev *et al.*, 2008). Die vorliegende Arbeit zeigt außerdem, dass verschiedene  $G\alpha_s$ -gekoppelte Rezeptoragonisten die TCR-induzierte Integrinaktivierung herunter-regulieren und somit vermutlich Effektor-T-Zellantworten.

Die Auswertung der Schlafragebögen zeigte eine Abnahme der Schläfrigkeit unter der Bedingung Schlaf sowie eine insgesamt gute Schlafqualität als auch Erholung. Die Schlafnacht fand im Schlaflabor unter standardisierten Konditionen nach Adaptionnacht statt. Es lässt sich davon ausgehen, dass die Probanden auch im Alltag in ihrer gewohnten Umgebung eine Abnahme der Schläfrigkeit erzielen, falls auf koffeinhaltige Getränke, blaues Licht durch technische Geräte vor dem Schlafengehen sowie Vermeidung von Lärm durch zum Beispiel Ohrstöpsel geachtet wird. Verstärkt werden kann das Ergebnis durch die gewohnte Umgebung. Dem entgegen steht das Nichtbeachten des natürlichen Schlafrhythmus der Probanden, der hier aufgrund der genormten Schlafenszeit nicht beachtet wurde. Zudem wurden die Patienten durch die Verweilkanüle samt Verbindungsschlauch zur nächtlichen Blutabnahme gestört. Die Versuchsteilnehmer durften im Rahmen des Versuches sich weder großen körperlichen noch seelischen Stress aussetzen. Hierbei kann vermutet werden, dass die Vermeidung von seelischer Belastung erholsamem Schlaf zuträglich ist, dass aber fehlende körperliche Betätigung, vor allem bei sportlich orientierten Personen, einem gesunden Schlaf bei fehlender „körperlicher Müdigkeit“ hinderlich ist. Kritisch ist anzumerken, dass nur drei Probanden mittels EEG gemessen wurden und somit ein weiterer Indikator für einen guten und erholsamen Schlaf fehlt, da keine objektive Aussage über das Durchlaufen der einzelnen Schlafstadien möglich ist. Auch wenn sich vermuten lässt, dass bei Abnahme der Schläfrigkeit auch die Tiefschlafphasen durchlaufen wurden.

Die Bedingung „Schlafentzug“ erzeugte eine Zunahme der Schläfrigkeit. Die Probanden wurden engmaschig kontrolliert und der Wachzustand kontrolliert. Die Auswertung der Fragebögen deutet einen kompletten Schlafentzug an. Indes würde eine komplette und permanente Überwachung zu mehr Stress für die Probanden und somit zu einer Verfälschung der Hormonspiegel und damit Ergebnisse führen.

Verwendung fand ein FACS-basierter Ansatz, der kürzlich von unserer Gruppe entwickelt wurde. Dieser ist imstande, die  $\beta_2$ -Integrin-abhängige Aktivierung von Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und ihren Subpopulationen abzubilden (Dimitrov *et al.*, 2018). Die Bindung von löslichen pMHC-Multimeren an den zugehörigen TCR markierte nicht nur die Antigen-spezifischen T-Zellen, sondern ermöglichte gleichermaßen die Identifizierung von aktivierten ICAM-1-Komplexen (Dimitrov *et al.*,



2018). Für die Beurteilung der Integrinaktivierung werden nur einige Minuten „ex-vivo“-Inkubation von Frischblut benötigt, sodass eine unverfälschte Beurteilung der funktionalen Eigenschaften der Mediatoren zulässt, im Kontrast zu früheren Assays, die Zellisolationen oder Zellkulturen benötigten (Chigaev *et al.*, 2008; Chigaev *et al.*, 2011). Außerdem erfordern ältere Vollblutassays zur Beurteilung den Effekt der verschiedenen Mediatoren lange Inkubationszeiten und Inhibition von Signalkaskaden, was schlussendlich nicht die „in vivo“-Bedingungen widerspiegelt (Chigaev *et al.*, 2008; Chigaev *et al.*, 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden die verschiedenen Leveländerungen von Katecholaminen und Prostaglandinen nicht dargestellt, auch wenn schon belegt wurde, dass Schlafentzug und morgendliches Erwachen durch erhöhte Plasmalevel von Epinephrin gekennzeichnet sind (Anstieg um bis zu  $1-3 \times 10^{-10}$  M (18-54 pg/ml)) (Dimitrov *et al.*, 2015). Diese Werte entsprechen ungefähr den Konzentrationen, die laut Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe für die Inhibition der Integrinaktivierung notwendig sind ( $10^{-10}$  M) (Dimitrov *et al.*, 2019). Unter den gleichen Bedingungen steigen die Konzentrationen von Norepinephrin bis auf  $1,5-3 \times 10^{-9}$  M (254-507 pg/ml) an, was nur leicht geringer als die Konzentration ist, die in unserer Studie zu einer signifikanten Hemmung der Integrinaktivierung führte ( $10^{-8}$  M), wobei beachtet werden muss, dass auch lokal in den SLO höhere Konzentrationen von Norepinephrin auftreten (Bellinger *et al.*, 2008; Elenkov *et al.*, 2000). Allgemein hin kann davon ausgegangen werden, dass durch Schlaf induzierte Konzentrationsabfälle von Katecholaminen maßgeblich zur Integrinaktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen beitragen. Außerdem haben mutmaßlich Prostaglandine und Adenosin, die hauptsächlich während des Schlafes vermindert ausgeschüttet werden (Haack *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011), einen Anteil am Anstieg der Integrinaktivierung. Jedoch bleibt diese Aussage vage, da die Konzentrationen dieser Substanzen während des Schlafes schwer zu ermitteln sind (Laitinen *et al.*, 1983; Shryock *et al.*, 1990).

Der inhibitorische Effekt von  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoragonisten wurde bei CMV-als auch bei EBV-spezifischen Zellen beobachtet, sodass vermutlich der Effekt nicht nur isoliert bei speziellen Antigen-spezifischen T-Zellen auftritt. Zudem ergab sich kein Effekt durch Schlaf auf die spät-differenzierten Zellen, gleichermaßen sahen wir einen Einfluss auf das Ausmaß der mICAM-1-Expression von früh- und mitteldifferenzierten

Zellen. Hierbei sahen wir gegenteilige Resultate zu früheren Studien, die eine Betonung der Epinephrin-induzierten Adhäsion in spät-differenzierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen postuliert hatten, zumal hier auch eine stärkere Expression von  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren vorliegt (Dimitrov *et al.*, 2010; Dimitrov *et al.*, 2009). Wobei hier konstatiert werden muss, dass sich die Studien im Sinne der verschiedenen Kaskaden der Integrinaktivierung von der vorliegenden Arbeit unterscheiden.

Während die Adhäsion der Subpopulationen der CMV-spezifischen Zellen gemessen wurde, ist es mit unserem Assay nicht möglich, naive T-Zellen zu messen. Auf den Messwerten für früh-differenzierte CMV-spezifische Zellen als sensitivste basierend, kann man davon ausgehen, dass naive T-Zellen gleichermaßen sensitiv auf die modulatorischen Effekte von  $G_{\alpha_s}$ -gekoppelten Rezeptoragonisten bezüglich der Adhäsion reagieren. Dass Schlaf wichtig in der Ausbildung der adaptiven Immunantwort ist, belegen vor allem in Studien mit Impfungen als Gegenstand von experimentellen Infektionen (Lange *et al.*, 2011; Lange *et al.*, 2003; Benedict *et al.*, 2012). Falls unsere Ergebnisse auf naive T-Zellen übertragbar sind und somit die Adhäsion von naiven T-Zellen und APCs gesteigert ist, könnte dies eine Erklärung für den positiven Effekt von Schlaf auf den Erfolg einer Impfung haben, und würde zudem einen Mechanismus offenlegen. Unsere Ergebnisse legen dar, dass Schlaf die Adhäsion von differenzierten Antigen-spezifischen T-Zellen fördert, und somit die Stärke von Effektor-T-Zellantworten anhebt. Insgesamt lässt sich davon ausgehen, dass Erkrankungen mit Schlafstörungen eine schwächere adaptive Immunantwort zur Folge haben (Feinsilver and Hernandez, 2017; Medina *et al.*, 2014; Roth, 2007).

Für die Krankheit Insomnie und ältere Menschen im Allgemeinen ist bekannt, dass sie eine niedrigere Schlafdauer- als auch Qualität aufweisen (Baglioni *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2012). Unter diesen Bedingungen ergeben sich chronisch erhöhte Level an Katecholaminen (Pfeifer *et al.*, 1983; Irwin *et al.*, 1999). Zudem kann eine erhöhte Infektanfälligkeit für beide Entitäten konstatiert werden (Savard *et al.*, 2003; Castle, 2000). Möglicherweise ergibt sich hierbei ein Zusammenhang im Sinne einer beeinträchtigten Integrinaktivierung und Ausbildung von immunologischen Synapsen.

Gemäß der Bedeutung der Integrine für die Adhäsion der T-Zellen zu ihren Zielzellen wie infizierten Zellen oder APC, ergeben diese Erkenntnisse einen neuen Zusammenhang zwischen Schlaf und Immunkompetenz. Schließlich ist zur

Ausbildung von immunologischen Synapsen eine Integrinaktivierung notwendig (Burbach *et al.*, 2007; Hogg *et al.*, 2011; Chigaev and Sklar, 2012; Dimitrov *et al.*, 2010), die somit einen wichtigen Teil der Immunantwort darstellt. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass diese Entdeckungen für verschiedene Krankheiten und Schlafstörungen als auch Stress-korrelierte Erkrankungen, die mit erhöhten Konzentrationen von  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoragonisten vergesellschaftet sind, bedeutend sind. Offen bleibt jedoch die Frage, inwiefern der Anstieg der Integrinaktivierung durch Schlaf einen funktionalen Benefit für die Ausbildung von T-Zellsynapsen und Zytotoxizität aufweist.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird der Einfluss von Schlaf und circadianer Rhythmik auf die Integrinaktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen thematisiert. Der Versuchsaufbau beinhaltet die Untersuchung von gesunden, aber CMV- und EBV-serologisch-positiven Probanden unter den Bedingungen Schlaf und Schlafentzug, unter Abbildung einer Zyklusfolge einer circadianen Rhythmik. Zwei Schlafragebögen zeigten eine adäquate Erholbarkeit des Schlafes, und korrelierend bei Schlafentzug eine Zunahme der Schläfrigkeit bei standardisierten Erhebungszeitpunkten.

Anhand einer neuartigen FACS-basierten Messmethode mittels Fluoreszenzmarkierten mICAM-1-Molekülen zur Detektion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten diese gemessen und differenziert werden sowie gleichsam gezeigt werden, dass unter der Bedingung „Schlaf“ zu nächtlichen Uhrzeiten eine vermehrte  $\beta_2$ -Integrin abhängige Aktivierung von CMV- und EBV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen stattfindet. Zudem zeigte sich unter dieser Bedingung für beide spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine circadiane Rhythmik hinsichtlich der  $\beta_2$ -Integrin abhängigen Aktivierung. Darüber hinaus wurde über eine Differenzierung der CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in die einzelnen Subpopulationen ein vermehrtes Ansprechen der früh- und mitteldifferenzierten Subpopulationen bezüglich der  $\beta_2$ -Integrin abhängigen Aktivierung erarbeitet.

Diese Entdeckungen legen nahe, dass Schlaf einen positiven Einfluss auf die Integrin-Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausübt und somit einen wichtigen Einfluss auf die adaptive Immunantwort und insgesamt die Immunkompetenz hat. Somit ergeben sich möglicherweise neue Optionen in der Therapie verschiedener Krankheiten wie Schlafstörungen, die erhöhte Konzentrationen von G $\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoragonisten aufweisen.

## References

- Abram, C.L. and Lowell, C.A. (2009), "The ins and outs of leukocyte integrin signaling", *Annual review of immunology*, Vol. 27, pp. 339–362.
- Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J. and Davis, M.M. (1996), "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 274 No. 5284, pp. 94–96.
- Amon, W. and Farrell, P.J. (2005), "Reactivation of Epstein-Barr virus from latency", *Reviews in medical virology*, Vol. 15 No. 3, pp. 149–156.
- Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M.A., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A., Little, S., Havlir, D.V., Richman, D.D., Gruener, N., Pape, G., Waters, A., Easterbrook, P., Salio, M., Cerundolo, V., McMichael, A.J. and Rowland-Jones, S.L. (2002), "Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections", *Nature medicine*, Vol. 8 No. 4, pp. 379–385.
- Appay, V., van Lier, R.A.W., Sallusto, F. and Roederer, M. (2008), "Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues", *Cytometry. Part A the journal of the International Society for Analytical Cytology*, Vol. 73 No. 11, pp. 975–983.
- Arango, M.-T., Kivity, S. and Shoenfeld, Y. (2015), "Is narcolepsy a classical autoimmune disease?", *Pharmacological research*, Vol. 92, pp. 6–12.
- Aserinsky, E. and Kleitman, N. (1953), "Regularly Occurring Periods of Eye Motility, and Concomitant Phenomena, During Sleep", *Science*, Vol. 118 No. 3062, pp. 273–274.
- Baglioni, C., Spiegelhalder, K., Regen, W., Feige, B., Nissen, C., Lombardo, C., Violani, C., Hennig, J. and Riemann, D. (2014), "Insomnia Disorder is Associated with Increased Amygdala Reactivity to Insomnia-Related Stimuli", *Sleep*, Vol. 37 No. 12, pp. 1907–1917.
- Barnes, P.D. and Grundy, J.E. (1992), "Down-regulation of the class I HLA heterodimer and beta 2-microglobulin on the surface of cells infected with cytomegalovirus", *The Journal of general virology*, 73 (Pt 9), pp. 2395–2403.
- Bellinger, D.L., Millar, B.A., Perez, S., Carter, J., Wood, C., ThyagaRajan, S., Molinaro, C., Lubahn, C. and Lorton, D. (2008), "Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease", *Cellular immunology*, Vol. 252 No. 1-2, pp. 27–56.
- Benedict, C., Brytting, M., Markström, A., Broman, J.-E. and Schiöth, H.B. (2012), "Acute sleep deprivation has no lasting effects on the human antibody titer response following a novel influenza A H1N1 virus vaccination", *BMC Immunology*, Vol. 13 No. 1, pp. 1–5.

- Bengtsson, A., Joergensen, L., Barbati, Z.R., Craig, A., Hviid, L. and Jensen, A.T.R. (2013), "Transfected HEK293 Cells Expressing Functional Recombinant Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) – A Receptor Associated with Severe Plasmodium falciparum Malaria", *PLOS ONE*, Vol. 8 No. 7, e69999.
- Besedovsky, L., Lange, T. and Born, J. (2012), "Sleep and immune function", *Pflugers Archiv European journal of physiology*, Vol. 463 No. 1, pp. 121–137.
- Besedovsky, L., Lange, T. and Haack, M. (2019), "The Sleep-Immune Crosstalk in Health and Disease", *Physiological reviews*, Vol. 99 No. 3, pp. 1325–1380.
- Betts, M.R., Brenchley, J.M., Price, D.A., Rosa, S.C. de, Douek, D.C., Roederer, M. and Koup, R.A. (2003), "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation", *Journal of immunological methods*, Vol. 281 No. 1-2, pp. 65–78.
- Born, J. and Fehm, H.L. (1998), "Hypothalamus-pituitary-adrenal activity during human sleep: a coordinating role for the limbic hippocampal system", *Experimental and clinical endocrinology & diabetes official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, Vol. 106 No. 3, pp. 153–163.
- Breitbart, M. and Rohwer, F. (2005), "Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?", *Trends in Microbiology*, Vol. 13 No. 6, pp. 278–284.
- Brudvik, K.W. and Taskén, K. (2012), "Modulation of T cell immune functions by the prostaglandin E2 – cAMP pathway in chronic inflammatory states", *British Journal of Pharmacology*, Vol. 166 No. 2, pp. 411–419.
- Burbach, B.J., Medeiros, R.B., Mueller, K.L. and Shimizu, Y. (2007), "T-cell receptor signaling to integrins", *Immunological Reviews*, Vol. 218, pp. 65–81.
- Butcher, E.C. (1991), "Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity", *Cell*, Vol. 67 No. 6, pp. 1033–1036.
- Castle, S.C. (2000), "Clinical Relevance of Age-Related Immune Dysfunction", *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 31 No. 2, pp. 578–585.
- Chagoya de Sanchez, V., Hernandez-Munoz, R., Diaz-Munoz, M., Villalobos, R., Glender, W., Vidrio, S., Suarez, J. and Yanez, L. (1983), "Circadian variations of adenosine level in blood and liver and its possible physiological significance", *Life Sciences*, Vol. 33 No. 11, pp. 1057–1064.
- Chigaev, A. and Sklar, L.A. (2012), "Overview: assays for studying integrin-dependent cell adhesion", *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, Vol. 757, pp. 3–14.
- Chigaev, A., Smagley, Y., Zhang, Y., Waller, A., Haynes, M.K., Amit, O., Wang, W., Larson, R.S. and Sklar, L.A. (2011), "Real-time Analysis of the Inside-out Regulation of Lymphocyte Function-associated Antigen-1 Revealed Similarities to and Differences from Very Late Antigen-4", *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 286 No. 23, pp. 20375–20386.

- Chigaev, A., Waller, A., Amit, O. and Sklar, L.A. (2008), "Galphas-coupled receptor signaling actively down-regulates alpha4beta1-integrin affinity: a possible mechanism for cell de-adhesion", *BMC immunology*, Vol. 9, p. 26.
- Chigaev, A., Waller, A., Zwartz, G.J., Buranda, T. and Sklar, L.A. (2007), "Regulation of cell adhesion by affinity and conformational unbending of alpha4beta1 integrin", *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, Vol. 178 No. 11, pp. 6828–6839.
- Chimelli, L. and Scaravilli, F. (1997), "Trypanosomiasis", *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, Vol. 7 No. 1, pp. 599–611.
- Covassin, N. and Singh, P. (2016), "Sleep Duration and Cardiovascular Disease Risk: Epidemiologic and Experimental Evidence", *Sleep medicine clinics*, Vol. 11 No. 1, pp. 81–89.
- Davidson, J.R., Moldofsky, H. and Lue, F.A. (1991), "Growth hormone and cortisol secretion in relation to sleep and wakefulness", *Journal of psychiatry & neuroscience JPN*, Vol. 16 No. 2, pp. 96–102.
- Davies, S.K., Ang, J.E., Revell, V.L., Holmes, B., Mann, A., Robertson, F.P., Cui, N., Middleton, B., Ackermann, K., Kayser, M., Thumser, A.E., Raynaud, F.I. and Skene, D.J. (2014), "Effect of sleep deprivation on the human metabolome", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 111 No. 29, pp. 10761–10766.
- Davis, M.M., Altman, J.D. and Newell, E.W. (2011), "Interrogating the repertoire: broadening the scope of peptide-MHC multimer analysis", *Nature reviews. Immunology*, Vol. 11 No. 8, pp. 551–558.
- Davis, M.M., Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B. and Chien, Y. (1998), "Ligand recognition by alpha beta T cell receptors", *Annual review of immunology*, Vol. 16, pp. 523–544.
- Dement, W. and Kleitman, N. (1957), "Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming", *undefined*.
- Diekelmann, S. and Born, J. (2010), "The memory function of sleep", *Nature reviews. Neuroscience*, Vol. 11 No. 2, pp. 114–126.
- Dimitrov, S., Benedict, C., Heutling, D., Westermann, J., Born, J. and Lange, T. (2009), "Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets", *Blood*, Vol. 113 No. 21, pp. 5134–5143.
- Dimitrov, S., Besedovsky, L., Born, J. and Lange, T. (2015), "Differential acute effects of sleep on spontaneous and stimulated production of tumor necrosis factor in men", *Brain, behavior, and immunity*, Vol. 47, pp. 201–210.
- Dimitrov, S., Gouttefangeas, C., Besedovsky, L., Jensen, A.T.R., Chandran, P.A., Rusch, E., Businger, R., Schindler, M., Lange, T., Born, J. and Rammensee, H.-G. (2018), "Activated integrins identify functional antigen-specific CD8+ T cells within minutes after antigen stimulation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 115 No. 24, E5536-E5545.

- Dimitrov, S., Lange, T. and Born, J. (2010), "Selective mobilization of cytotoxic leukocytes by epinephrine", *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, Vol. 184 No. 1, pp. 503–511.
- Dimitrov, S., Lange, T., Gouttefangeas, C., Jensen, A.T.R., Szczepanski, M., Lehnnolz, J., Soekadar, S., Rammensee, H.-G., Born, J. and Besedovsky, L. (2019), "Gas-coupled receptor signaling and sleep regulate integrin activation of human antigen-specific T cells", *The Journal of experimental medicine*, Vol. 216 No. 3, pp. 517–526.
- Dimitrov, S., Lange, T., Tieken, S., Fehm, H.L. and Born, J. (2004), "Sleep associated regulation of T helper 1/T helper 2 cytokine balance in humans", *Brain, behavior, and immunity*, Vol. 18 No. 4, pp. 341–348.
- Dustin, M.L. (2014), "The immunological synapse", *Cancer immunology research*, Vol. 2 No. 11, pp. 1023–1033.
- Dustin, M.L. and Long, E.O. (2010), "Cytotoxic immunological synapses", *Immunological reviews*, Vol. 235 No. 1, pp. 24–34.
- Dustin, M.L. and Springer, T.A. (1989), "T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1", *Nature*, Vol. 341 No. 6243, pp. 619–624.
- Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Chrousos, G.P. and Vizi, E.S. (2000), "The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system", *Pharmacological reviews*, Vol. 52 No. 4, pp. 595–638.
- Evans, R., Patzak, I., Svensson, L., Filippo, K.D., Jones, K., McDowall, A. and Hogg, N. (2009), "Integrins in immunity", *Journal of cell science*, Vol. 122 No. 2, pp. 215–225.
- Feinsilver, S.H. and Hernandez, A.B. (2017), "Sleep in the Elderly: Unanswered Questions", *Clinics in Geriatric Medicine*, Vol. 33 No. 4, pp. 579–596.
- Ferrie, J.E., Shipley, M.J., Cappuccio, F.P., Brunner, E., Miller, M.A., Kumari, M. and Marmot, M.G. (2007), "A prospective study of change in sleep duration: associations with mortality in the Whitehall II cohort", *Sleep*, Vol. 30 No. 12, pp. 1659–1666.
- Fooksman, D.R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D., Waite, J., Sacristán, C., Vitoria, G., Zanin-Zhorov, A. and Dustin, M.L. (2010), "Functional Anatomy of T Cell Activation and Synapse Formation", *Annual review of immunology*, Vol. 28, pp. 79–105.
- Gillespie, G.M., Wills, M.R., Appay, V., O'Callaghan, C., Murphy, M., Smith, N., Sissons, P., Rowland-Jones, S., Bell, J.I. and Moss, P.A. (2000), "Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors", *Journal of virology*, Vol. 74 No. 17, pp. 8140–8150.
- Goldstein, J.S., Chen, T., Gubina, E., Pastor, R.W. and Kozlowski, S. (2000), "ICAM-1 enhances MHC-peptide activation of CD8+ T cells without an organized



- immunological synapse”, *European journal of immunology*, Vol. 30 No. 11, pp. 3266–3270.
- Gouttefangeas, C., Schuhmacher, J. and Dimitrov, S. (2019), “Adhering to adhesion: assessing integrin conformation to monitor T cells”, *Cancer Immunology, Immunotherapy*.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. and Dustin, M.L. (1999), “The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation”, *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 285 No. 5425, pp. 221–227.
- Haack, M., Lee, E., Cohen, D.A. and Mullington, J.M. (2009), “Activation of the prostaglandin system in response to sleep loss in healthy humans: potential mediator of increased spontaneous pain”, *Pain*, Vol. 145 No. 1-2, pp. 136–141.
- Hadrup, S.R., Maurer, D., Laske, K., Frøsig, T.M., Andersen, S.R., Britten, C.M., Burg, Sjoerd H. van der, Walter, S. and Gouttefangeas, C. (2015), “Cryopreservation of MHC multimers: Recommendations for quality assurance in detection of antigen specific T cells”, *Cytometry Part A*, Vol. 87 No. 1, pp. 37–48.
- Heinrich, P.C., Müller, M. and Graeve, L. (Eds.) (2014), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Lehrbuch*, 9., vollständig überarbeitete Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Herold, G. (Ed.) (2017), *Innere Medizin 2017: Eine vorlesungsorientierte Darstellung unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*, Gerd Herold, Köln.
- Hogg, N., Patzak, I. and Willenbrock, F. (2011), “The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function”, *Nature Reviews Immunology*, Vol. 11 No. 6, p. 416.
- Huang, J., Zeng, X., Sigal, N., Lund, P.J., Su, L.F., Huang, H., Chien, Y.-h. and Davis, M.M. (2016), “Detection, phenotyping, and quantification of antigen-specific T cells using a peptide-MHC dodecamer”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 113 No. 13, E1890-7.
- Huang, Z.-L., Urade, Y. and Hayaishi, O. (2011), “The role of adenosine in the regulation of sleep”, *Current topics in medicinal chemistry*, Vol. 11 No. 8, pp. 1047–1057.
- Hynes, R.O. (1992), “Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion”, *Cell*, Vol. 69 No. 1, pp. 11–25.
- Hynes, R.O. (2002), “Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines”, *Cell*, Vol. 110 No. 6, pp. 673–687.
- Ibrahim, S.F. and van den Engh, G. (2007), “Flow Cytometry and Cell Sorting”, in Kumar, A., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. and Aarvak, T. (Eds.), *Cell separation: Fundamentals, analytical and preparative methods, Advances in biochemical engineering, biotechnology*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 19–39.

- Irwin, M., Thompson, J., Miller, C., Gillin, J.C. and Ziegler, M. (1999), "Effects of Sleep and Sleep Deprivation on Catecholamine And Interleukin-2 Levels in Humans: Clinical Implications 1", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Vol. 84 No. 6, pp. 1979–1985.
- Jondal, M. and Klein, G. (1973), "Surface markers on human B and T lymphocytes. II. Presence of Epstein-Barr virus receptors on B lymphocytes", *The Journal of experimental medicine*, Vol. 138 No. 6, pp. 1365–1378.
- Kamperis, K., Hansen, M.N., Hagstroem, S., Hvistendahl, G., Djurhuus, J.C. and Rittig, S. (2004), "The circadian rhythm of urine production, and urinary vasopressin and prostaglandin E2 excretion in healthy children", *The Journal of urology*, Vol. 171 No. 6 Pt 2, pp. 2571–2575.
- Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S., Baumann, R., Brenner, B., Gay, R. and Rothenburger, A. (Eds.) (2010), *Physiologie*, 6., vollständig überarb. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- Kothare, S.V. and Kaleyias, J. (2008), "Narcolepsy and other hypersomnias in children", *Current opinion in pediatrics*, Vol. 20 No. 6, pp. 666–675.
- Krueger, J.M. and Opp, M.R. (2016), "Chapter Ten - Sleep and Microbes", in Cryan, J.F. and Clarke, G. (Eds.), *International Review of Neurobiology Gut Microbiome and Behavior*, Vol. 131, Academic Press, pp. 207–225.
- Kwon, Y., Koene, R.J., Johnson, A.R., Lin, G.-M. and Ferguson, J.D. (2018), "Sleep, sleep apnea and atrial fibrillation: Questions and answers", *Sleep medicine reviews*, Vol. 39, pp. 134–142.
- Lachmann, R., Bajwa, M., Vita, S., Smith, H., Cheek, E., Akbar, A. and Kern, F. (2012), "Polyfunctional T cells accumulate in large human cytomegalovirus-specific T cell responses", *Journal of virology*, Vol. 86 No. 2, pp. 1001–1009.
- Laitinen, O., Seppälä, E., Nissilä, M. and Vapaatalo, H. (1983), "Plasma levels and urinary excretion of prostaglandins in patients with rheumatoid arthritis", *Clinical Rheumatology*, Vol. 2 No. 4, pp. 401–406.
- Lange, T., Born, J. and Westermann, J. (2019), "Sleep Matters: CD4(+) T Cell Memory Formation and the Central Nervous System", *Trends in immunology*, Vol. 40 No. 8, pp. 674–686.
- Lange, T., Dimitrov, S., Bollinger, T., Diekelmann, S. and Born, J. (2011), "Sleep after vaccination boosts immunological memory", *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, Vol. 187 No. 1, pp. 283–290.
- Lange, T., Dimitrov, S. and Born, J. (2010), "Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system", *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1193, pp. 48–59.
- Lange, T., Perras, B., Fehm, H.L. and Born, J. (2003), "Sleep enhances the human antibody response to hepatitis A vaccination", *Psychosomatic medicine*, Vol. 65 No. 5, pp. 831–835.

- Leproult, R. and van Cauter, E. (2010), "Role of Sleep and Sleep Loss in Hormonal Release and Metabolism", *Endocrine development*, Vol. 17, pp. 11–21.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. and Nourshargh, S. (2007), "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated", *Nature Reviews Immunology*, Vol. 7 No. 9, pp. 678–689.
- Ljungman, P., Griffiths, P. and Paya, C. (2002), "Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients", *Clinical infectious diseases an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, Vol. 34 No. 8, pp. 1094–1097.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (2000), *Viruses: Structure, Function, and Uses*, W. H. Freeman.
- Lombardi, M.S., Kavelaars, A., Cobelens, P.M., Schmidt, R.E., Schedlowski, M. and Heijnen, C.J. (2001), "Adjuvant Arthritis Induces Down-Regulation of G Protein-Coupled Receptor Kinases in the Immune System", *The Journal of Immunology*, Vol. 166 No. 3, pp. 1635–1640.
- Long, E.O. (2011), "ICAM-1: getting a grip on leukocyte adhesion", *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, Vol. 186 No. 9, pp. 5021–5023.
- Maeda, E., Akahane, M., Kiryu, S., Kato, N., Yoshikawa, T., Hayashi, N., Aoki, S., Minami, M., Uozaki, H., Fukayama, M. and Ohtomo, K. (2009), "Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review", *Japanese journal of radiology*, Vol. 27 No. 1, pp. 4–19.
- Medina, A.B., Lechuga, D.A., Escandón, O.S. and Moctezuma, J.V. (2014), "Update of sleep alterations in depression", *Sleep Science*, Vol. 7 No. 3, pp. 165–169.
- Moller, J.F., Moller, B., Wiedenmann, B., Berg, T. and Schott, E. (2011), "CD154, a marker of antigen-specific stimulation of CD4 T cells, is associated with response to treatment in patients with chronic HCV infection", *Journal of viral hepatitis*, Vol. 18 No. 7, e341-9.
- Morgan, D.G., Niederman, J.C., Miller, G., Smith, H.W. and Dowaliby, J.M. (1979), "Site of Epstein-Barr virus replication in the oropharynx", *Lancet (London, England)*, Vol. 2 No. 8153, pp. 1154–1157.
- Müller-Esterl, W. (2018), *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger, Lehrbuch*, 3. korrigierte Auflage, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Nowalk, A. and Green, M. (2016), "Epstein-Barr Virus", *Microbiology Spectrum*, Vol. 4 No. 3.
- Packiriswamy, N. and Parameswaran, N. (2015), "G-protein coupled receptor kinases in inflammation and disease", *Genes and immunity*, Vol. 16 No. 6, pp. 367–377.

- Pattengale, P.K., Smith, R.W. and Gerber, P. (1973), "Selective transformation of B lymphocytes by E.B. virus", *Lancet (London, England)*, Vol. 2 No. 7820, pp. 93–94.
- Pfeifer, M.A., Weinberg, C.R., Cook, D., Best, J.D., Reenan, A. and Halter, J.B. (1983), "Differential changes of autonomic nervous system function with age in man", *The American Journal of Medicine*, Vol. 75 No. 2, pp. 249–258.
- Pipkin, M.E. and Lieberman, J. (2007), "Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works", *Current opinion in immunology*, Vol. 19 No. 3, pp. 301–308.
- Qin, J., Vinogradova, O. and Plow, E.F. (2004), "Integrin bidirectional signaling: a molecular view", *PLoS biology*, Vol. 2 No. 6, e169.
- Rasch, B. and Born, J. (2013), "About sleep's role in memory", *Physiological reviews*, Vol. 93 No. 2, pp. 681–766.
- Rechtschaffen A and Kales A (1968), *A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects*.
- Robert-Koch-Institut, "Cytomegalievirus", available at: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Zytomegalie\\_virus.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Zytomegalie_virus.html).
- Rockstrom, M.D., Chen, L., Taishi, P., Nguyen, J.T., Gibbons, C.M., Veasey, S.C. and Krueger, J.M. (2018), "Tumor necrosis factor alpha in sleep regulation", *Sleep medicine reviews*, Vol. 40, pp. 69–78.
- Romeijn, N., Raymann, R.J.E.M., Møst, E., Te Lindert, B., van der Meijden, W.P., Fronczek, R., Gomez-Herrero, G. and van Someren, E.J.W. (2011), "Sleep, vigilance, and thermosensitivity", *Pflugers Archiv*, Vol. 463 No. 1, pp. 169–176.
- Roth, T. (2007), "Insomnia: Definition, Prevalence, Etiology, and Consequences", *Journal of Clinical Sleep Medicine JCSM official publication of the American Academy of Sleep Medicine*, Vol. 3 No. 5 Suppl, S7-S10.
- Rothlein, R., Dustin, M.L., Marlin, S.D. and Springer, T.A. (1986), "A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1", *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, Vol. 137 No. 4, pp. 1270–1274.
- Sadamatsu, M., Kato, N., Iida, H., Takahashi, S., Sakaue, K., Takahashi, K., Hashida, S. and Ishikawa, E. (1995), "The 24-hour rhythms in plasma growth hormone, prolactin and thyroid stimulating hormone: effect of sleep deprivation", *Journal of neuroendocrinology*, Vol. 7 No. 8, pp. 597–606.
- Sandoval, Y., Lobo, A.S., Somers, V.K., Rosenfield, K., Bradley, S.M., Sorajja, P., Tajti, P. and Brilakis, E.S. (2018), "Sleep deprivation in interventional cardiology: Implications for patient care and physician-health", *Catheterization and cardiovascular interventions official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, Vol. 91 No. 5, pp. 905–910.

- Sato, N., Marui, S., Ozaki, M. and Nagashima, K. (2015), "Cold exposure and/or fasting modulate the relationship between sleep and body temperature rhythms in mice", *Physiology & Behavior*, Vol. 149, pp. 69–75.
- Savard, J., Laroche, L., Simard, S., Ivers, H. and Morin, C.M. (2003), "Chronic Insomnia and Immune Functioning", *Psychosomatic medicine*, Vol. 65 No. 2, pp. 211–221.
- Schedlowski, M. and Tewes, U. (Eds.) (1999), *Psychoneuroimmunology: An interdisciplinary introduction*, Kluwer Academic/Plenum Publ, New York.
- Schmidt, C., Peigneux, P. and Cajochen, C. (2012), "Age-Related Changes in Sleep and Circadian Rhythms: Impact on Cognitive Performance and Underlying Neuroanatomical Networks", *Frontiers in Neurology*, Vol. 3.
- Shryock, J.C., Boykin, M.T., Hill, J.A. and Belardinelli, L. (1990), "A new method of sampling blood for measurement of plasma adenosine", *The American journal of physiology*, Vol. 258 No. 4 Pt 2, H1232-9.
- Smart, P. (1999), *Everything You Need to Know About Mononucleosis*, Rosen Publishing Group.
- Springer, T.A. and Dustin, M.L. (2012), "Integrin inside-out signaling and the immunological synapse", *Current opinion in cell biology*, Vol. 24 No. 1, pp. 107–115.
- Stubbe, M., Vanderheyde, N., Pircher, H., Goldman, M. and Marchant, A. (2008), "Characterization of a subset of antigen-specific human central memory CD4+ T lymphocytes producing effector cytokines", *European journal of immunology*, Vol. 38 No. 1, pp. 273–282.
- Toebe, M., Coccorsis, M., Bins, A., Rodenko, B., Gomez, R., Nieuwkoop, N.J., van de Kastele, W., Rimmelzwaan, G.F., Haanen, John B A G, Ovaas, H. and Schumacher, T.N.M. (2006), "Design and use of conditional MHC class I ligands", *Nature Medicine*, Vol. 12 No. 2, pp. 246–251.
- Tominaga, Y., Kita, Y., Satoh, A., Asai, S., Kato, K., Ishikawa, K., Horiuchi, T. and Takashi, T. (1998), "Affinity and kinetic analysis of the molecular interaction of ICAM-1 and leukocyte function-associated antigen-1", *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, Vol. 161 No. 8, pp. 4016–4022.
- Toro, A.I. and Ossa, J. (1996), "PCR activity of CMV in healthy CMV-seropositive individuals: does latency need redefinition?", *Research in virology*, Vol. 147 No. 4, pp. 233–238.
- Waller, E.C.P., Day, E., Sissons, J.G.P. and Wills, M.R. (2008), "Dynamics of T cell memory in human cytomegalovirus infection", *Medical microbiology and immunology*, Vol. 197 No. 2, pp. 83–96.
- Wang, H. and Rudd, C.E. (2008), "SKAP-55, SKAP-55-related and ADAP adaptors modulate integrin-mediated immune-cell adhesion", *Trends in cell biology*, Vol. 18 No. 10, pp. 486–493.

- Weitzman, E.D. (1976), "Circadian rhythms and episodic hormone secretion in man", *Annual review of medicine*, Vol. 27, pp. 225–243.
- Wolf, M., Kuball, J., Ho, W.Y., Nguyen, H., Manley, T.J., Bleakley, M. and Greenberg, P.D. (2007), "Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities", *Blood*, Vol. 110 No. 1, pp. 201–210.
- Yachie, A., Kanegane, H. and Kasahara, Y. (2003), "Epstein-Barr virus-associated T-/natural killer cell lymphoproliferative diseases", *Seminars in hematology*, Vol. 40 No. 2, pp. 124–132.
- Zanchetti, A., Baccelli, G. and Mancia, G. (1982), "Cardiovascular regulation during sleep", *Archives italiennes de biologie*, Vol. 120 No. 1-3, pp. 120–137.

## **Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde im Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensneurobiologie unter Betreuung von Prof. Dr. Jan Born durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Luciana Besedovsky, Betreuer und Dr. Stoyan Dimitrov, Betreuer.

Die Versuche wurden von mir und mit Unterstützung durch Jannik Lehnholz (Co-Doktorand) sowie Ammr Al-Banna (wissenschaftliche Hilfskraft) durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. Stoyan Dimitrov durch mich.

Die Formatierung der Tabellen und der Arbeit erfolgte mit Hilfe von Dr. Daniel Goldmann und Dr. Stoyan Dimitrov.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 10.09.2019

## Anhang

### Fragebögen

- Stanford- Schläfrigkeits- Skala
- SF-A-R



## Stanford-Schläfrigkeits-Skala

Probanden-Nr.:

Datum:

abends / morgens

Im Folgenden soll der Grad der Schläfrigkeit (wie wach fühlen Sie sich?) erhoben werden: Kreuzen Sie bitte das entsprechende Kästchen an.

Schläfrigkeitsgrad	Punktwert
Ich fühle mich aktiv, lebhaft, aufmerksam oder sehr wach	1
Ich kann konzentriert arbeiten, habe aber kein Leistungshoch	2
Ich fühle mich wach, entspannt und aufnahmefähig aber nicht voll konzentriert	3
Ich fühle mich irgendwie träge	4
Ich fühle mich träge, verlangsamt, und könnte mich hinlegen	5
Ich fühle mich schläfrig, benebelt, kämpfe gegen die Müdigkeit und würde mich lieber hinlegen	6
Ich bin kurz vor dem Einschlafen und habe bereits Traumandeutungen	7
Ich schlafe	8

Diese Skala dient der Beschreibung des Wachheitszustandes des Probandes anhand von vorgegebenen Aussagen, die einen Punktwert symbolisieren. Anhand der Punktwerte können Rückschlüsse auf die Schlafqualität und Tagesschläfrigkeit gezogen werden.

## Fragebogen zur Schlafqualität (SF-A-R)

Proband: \_\_\_\_\_/ \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_

Ankunft: \_\_\_\_\_ Uhr

Licht aus: \_\_\_\_\_ Uhr

Eingeschlafen: \_\_\_\_ Uhr

Licht an/Aufgewacht: \_\_ Uhr

### Anleitung:

Die folgenden Fragen beziehen sich darauf, wie Sie in der letzten Nacht geschlafen haben. Kreuzen Sie bitte die Antworten an, die für Sie am ehesten zutreffen. Gehen Sie bei der Beantwortung der Fragen zügig voran und lassen Sie keine Frage aus. Bitte sofort nach dem Aufwachen morgens aus- füllen!

### 1.) Konnten Sie, nachdem Sie sich schlafen gelegt hatten, gleich einschlafen?

Ja.	
Nein, erst nach 10 min.	
Nein, erst nach 20 min.	
Nein, erst nach 40 min.	
Nein, erst nach 1 Stunde.	
Nein, erst nach mehr als 1 Stunde.	
Ich konnte überhaupt nicht schlafen.	

#### 1.a) Falls Nein, welches waren die Gründe? (Mehrfachnennungen möglich)

Persönliche / berufliche Probleme	
Geräusche im Zimmer oder von draußen	
Beschäftigung mit Tagesereignissen	
Ungewohnte Schlafumgebung	
Sonstige:	

### 2.) In der Einschlafphase hat man hin und wieder plötzlich deutliche Bildeindrücke. War dies gestern Abend bei Ihnen so?

Nein	Bin nicht sicher	Ja, sehr deutlich

**3.) Hatten Sie während der Einschlafphase Muskelzuckungen in den Armen oder Beinen?**

Nein	Leicht	Stark

**4.) Sind Sie gestern nach dem Einschlafen nachts wieder aufgewacht?**

Nein	1x	2x	3x	>3x

4.a) Falls Ja, welches waren die Gründe? (Mehrfachnennungen möglich)

Persönliche / berufliche Probleme	
Geräusche im Zimmer oder von draußen	
Ich musste zur Toilette	
Ich hatte schlecht geträumt	
Sonstige:	

4.b) Falls Ja, wie lange waren Sie ungefähr wach? (Schätzen Sie bitte.)

1. Aufwachen	Dauer (min):	
2. Aufwachen	Dauer (min):	
3. Aufwachen	Dauer (min):	
4. Aufwachen	Dauer (min):	

**5.) Können Sie sich erinnern, ob Sie heute Nacht geträumt haben?**

Nein, ich kann mich nicht erinnern geträumt zu haben	
Ja, ich habe geträumt, kann mich aber nicht mehr an den Trauminhalt erinnern.	
Ja, ich habe geträumt und kann mich an den Trauminhalt erinnern.	

5a.) Falls ja, welche Gefühle hatten Sie während des Träumens (Mehrfachnennungen möglich)

Angenehm	Neutral	Unangenehm

5b) Falls ja, was war (grob) der Inhalt der Träume


6.) Haben Sie in der letzten Nacht geschwitzt?

Nein	Leicht	Stark

7.) Haben Sie heute Morgen Kopfschmerzen?

Nein	Leicht	Stark

8.) War der gestrige Tag für Sie anstrengend?

Nein	Ein wenig	Sehr

**Anleitung:**

Auf dieser Seite finden Sie einige Wörter, mit denen Sie beschreiben können, wie Sie sich gestern Abend fühlten, wie Sie heute Nacht geschlafen haben und wie Sie sich heute Morgen fühlen. Kreuzen Sie hinter jedem Wort an, in welchem Ausmaß es für Sie zutrifft. Bitte antworten Sie zügig und lassen Sie keine Zeile aus!

9.) Wie haben Sie letzte Nacht geschlafen?

	Sehr	Ziemlich	Mittel	Wenig	Nicht
a) gleichmäßig					
b) tief					
c) gut					
d) entspannt					
e) ungestört					
f) ruhig					
g) ausgiebig					

**10.) Wie fühlten Sie sich gestern vor dem Schlafengehen?**

	Sehr	Ziemlich	Mittel	Wenig	Nicht
a) sorglos					
b) erschöpft					
c) schlafbedürftig					
d) überfordert					
e) ausgeglichen					
f) ruhig					
g) müde					
h) entspannt					

**11.) Wie fühlen Sie sich heute Morgen?**

	Sehr	Ziemlich	Mittel	Wenig	Nicht
a) Ausgeglichen					
b) Dösig					
c) Tatkräftig					
d) munter					
e) frisch					
f) ausgeschlafen					
g) entspannt					

Der SF-A-R stellt einen Fragebogen mit insgesamt 35 Fragen dar, um Erkenntnisse über die Schlafqualität und -Quantität der letzten Nacht zu erzielen. Im Fokus der Betrachtungen liegen zudem Träume, körperliche Anstrengung und vegetative Symptome wie Transpiration.

## **Danksagung**

Prof. Dr. Jan Born, dem Leiter des Instituts für Medizinische Psychologie und Verhaltensneurobiologie, danke ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas und die im Institut vorherrschenden Bedingungen, die eine fordernde als auch erfüllende Erschließung der Thematik ermöglichten.

Ein besonderer und sehr herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Dr. Stoyan Dimitrov für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit. Auf seine wissenschaftliche Expertise konnte ich mich stets verlassen. Besonderen Dank widme ich auch seiner Genauigkeit und Geduld beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön gilt auch meiner Betreuerin Dr. Luciana Besedovsky für die freundliche und tatkräftige Unterstützung.

Eine große Freude war mir die Zusammenarbeit mit den Kollegen des gesamten Institutes, hervorheben möchte ich meinen Doktoranden-Kollegen Jannik Lehnholz, verbunden mit einem herzlichen Dankeschön.

Meiner gesamten Familie als auch meinem Freundeskreis danke ich von Herzen für jedwede Unterstützung in den schönen und schweren Zeiten der Entstehung der vorliegenden Arbeit.